

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**SPECIACE ANORGANICKÝCH FOREM CHROMU
KOMBINOVANOU METODOU HPLC – ICP AES**

Speciation analysis of inorganic forms of chromium with
coupled technique HPLC – ICP AES

Diplomová práce
studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Petra Voldřichová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....

podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc za odborné vedení, všechny rady a připomínky. Dále paní Doc. Ing. Jiřině Szákové, CSc z České zemědělské univerzity v Praze za vstřícný přístup při spolupráci.

Můj dík patří také rodině a všem přátelům za jejich podporu

Předmětová hesla: analytická chemie

Klíčová slova: speciální analýza, chrom, atomová emisní spektrometrie, indukčně vázaná plazma, HPLC, iontově výměnná chromatografie

Práce byla podporována projektem MŠMT: MSM 0021620857

1 OBSAH

1	OBSAH	5
2	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	6
3	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	8
4	TEORETICKÁ ČÁST	9
4.1	Speciační analýza	9
4.2	Frakcionace	11
4.2.1	Aplikace metod chemické frakcionace na ovzduší	12
4.3	Chrom a význam jeho speciace	13
4.4	Atomová emisní spektrometrie	15
4.4.1	Indukčně vázaná plazma	16
4.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
4.5.1	Mobilní fáze v HPLC	18
4.5.2	Stacionární fáze v HPLC	18
4.5.3	Iontově výměnná chromatografie	19
4.6	Statistické zpracování výsledků	20
4.6.1	Měření	20
4.6.2	Citlivost	20
4.6.3	Šum	20
4.6.4	Kalibrace	20
4.6.5	Mez detekce a mez stanovitelnosti	21
4.6.6	Opakovatelnost	21
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
5.1	Spektrometr a jeho příslušenství	22
5.2	Ostatní přístroje a zařízení	22
5.3	Používaná aparatura	22
5.4	Použité chemikálie a reagensy	23
6	VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE	25
6.1	OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY SEPARACE	25
6.1.1	Složení mobilní fáze	25
6.1.2	pH mobilní fáze	28
6.1.3	Dávkovaný objem	29
6.1.4	Vliv přídavku komplexotvorného činidla přidávaného ke vzorku	30
6.1.5	Výsledné shrnutí optimálních podmínek kombinovaného stanovení	33
6.2	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY KOMBINOVANÉ METODY STANOVENÍ OBOU FOREM Cr	34
6.3	VLIV VYLUHOVACÍCH ČINIDEL	37
6.3.1	Kyselá vyluhovací činidla	37
6.3.1.1	Kyselina octová	38
6.3.1.2	Hydroxylamin	41
6.3.1.3	Octan amonný	42
6.3.2	Alkalická vyluhovací činidla	46
6.3.2.1	Uhlíčitan sodný	46
6.3.2.2	Hydroxid sodný	47
7	ZÁVĚR	51
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52

2 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
c	koncentrace
CDTA	kyselina cyklohexan-1,2-diamin-N,N,N,N-tetraoctová
CE	kapilární elektroforéza
DCP	stejnoseměrná plazma
E	energie
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPA	Environmental Protection Agency
GC	plynová chromatografie
h	Planckova konstanta
H	výška teoretického patra
HG	generování hydridů
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP	indukčně vázaná plazma
IEC	iontově výměnná chromatografie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k	citlivost
kW	kilowatt
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
mg	miligram
min	minuta
MIP	mikrovlnně indukovaná plazma
ml	mililitr
MS	hmotnostní spektrometrie
nm	nanometr
NMR	nukleární magnetická resonance
NOAEL	no observable adverse effect level

O	opakovatelnost
Q_{MF}	průtok mobilní fáze
R	rozlišení
s	sekunda
t	čas
u	průtoková rychlost
v	frekvence
w	šířka píku při základně
Φ	hustota zářivého toku
λ	vlnová délka
μl	mikrolitr
σ	směrodatná odchylka

3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato diplomová práce přímo navazuje na diplomovou práci vypracovanou na katedře analytické chemie v roce 2008 týkající se stejného tématu. Ve zmíněné práci byly hledány optimální podmínky pro speciální analýzu chromu metodou HPLC s detekcí pomocí AES-ICP. Ukázalo se však, že použitá anexová kolona firmy Supelco byla poškozená.

V této diplomové práci tedy byly v první části ověřeny optimální podmínky pro separaci forem chromu na nové anexové koloně firmy Hamilton a stanoveny základní charakteristiky kombinované metody pro stanovení forem Cr(III) a Cr(VI) (LOD, LOQ, opakovatelnost).

Ve druhé části pak byla sledována stabilita obou anorganických forem Cr ve vyluhovacích činidlech používaných při jejich frakcionaci ve vzorcích půdy a poléťavého prachu. Zároveň byl sledován vliv těchto vyluhovacích činidel na citlivost a správnost stanovení jednotlivých forem Cr.

Práce byla vypracována ve spolupráci s katedrou agrochemie a výživy rostlin České zemědělské univerzity v Praze.

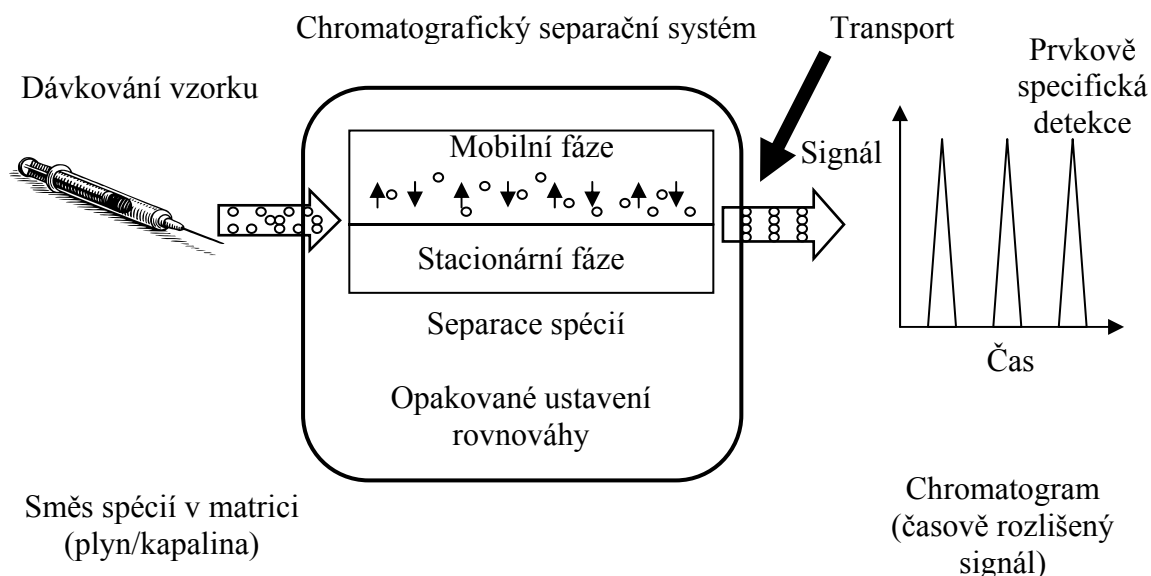
4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Speciační analýza

Podle definice IUPAC se speciační analýzou rozumí analytické aktivity směřující k identifikaci nebo ke stanovení jedné nebo více jednotlivých chemických specií ve vzorku. Chemická specie je specifická forma prvku definovaná izotopickým složením, elektronickým nebo oxidačním stavem, případně strukturou komplexu nebo molekuly [1]. Rozdíly v těchto vlastnostech mohou ovlivňovat reaktivitu, mobilitu, biologickou dostupnost a toxicitu prvků, což je hlavním důvodem k provádění speciační analýzy a sledování speciace různých analytů ve vzorcích. Významné jsou především vzorky úzce související se zdravím člověka. Jsou to vzorky potravin a surovin pro jejich výrobu, vzorky pocházející z životního prostředí a vzorky tělních tekutin a tkání, jejichž analýza umožňuje studium kinetiky stopových prvků v organismu.

Stejně jako chemickou analýzu obecně tak i speciační analýzu lze rozdělit na analýzu kvalitativní a kvantitativní. Při kvalitativní analýze je výsledkem pouze informace o přítomnosti nebo nepřítomnosti jednotlivých specií ve vzorku. Kvantitativní analýza vede také k získání informace o množství identifikovaných specií ve vzorku.

Proces kvantitativní speciační analýzy lze rozdělit na následující fáze: příprava vzorku, separace jednotlivých specií, detekce a stanovení dané specie a případně identifikace struktury vazebného partnera prvku pomocí vhodné molekulově specifické detekční techniky (NMR). Separační a detekční část analýzy může být provedena s časovou prodlevou – off-line techniky, nebo bezprostředně po sobě – on-line (hyphenated) techniky. V současné době se používá skoro výhradně on-line uspořádání. Schéma takového uspořádání ukazuje obr. 4.1 [2].



Obr. 4.1: On-line spojení separační techniky s prvkově selektivním detektorem

K separaci jednotlivých specií se používají chromatografické (GC, HPLC) nebo elektromigrační metody (CE). K detekci poté prvkově selektivní detektory, kterými jsou nejčastěji přístroje pro atomovou spektrometrii (AAS, AFS, ICP-AES, ICP-MS). V nejjednodušším případě lze výstup ze separačního systému spojit s detektorem přímo (např. spojení HPLC-ICP-AES). V jiných případech (kombinacích separační techniky a detektoru) je třeba mezi separační systém a detektor zařadit interface, který často zahrnuje derivatizaci analytu (např. převedení na těkavou sloučeninu, ethylace). Toto uspořádání je využito např. v metodě HPLC-HG-AFS. Derivatizační krok může být zařazen i před separační část analýzy např. v uspořádání HG-GC-AAS

4.2 Frakcionace

Podle definice IUPAC je frakcionace prvků proces třídění analytů nebo skupiny analytů v dané matrici na základě jejich fyzikálních (velikost, rozpustnost) nebo chemických (reaktivita) vlastností. Jedním z možných přístupů k frakcionaci je postupná extrakce, která neposkytuje přesně definované specie, ale frakce definované pouze operačním postupem. V praxi se tato metoda používá pro stanovení frakcí chemických prvků v půdách, sedimentech, popílcích apod. Postupná frakcionace zahrnuje několik kroků (3-8), přičemž v každém se použije jiné vyluhovací činidlo. Každé další použité činidlo je buď silnější než předešlé nebo zcela chemicky odlišné. Zařazením většího počtu kroků dosáhneme větší selektivity. Důležité je dodržení všech podmínek, které postup frakcionace charakterizují např. koncentrace a pH extrakčních činidel, posloupnost extrakčních kroků, poměr vzorku k extrakčnímu činidlu, teplota při extrakci. Nejčastěji používanými činidly jsou voda, neutrální roztoky anorganických solí (CaCl_2 , NaNO_3), roztoky solí s upraveným pH ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) a slabé roztoky chelatačních činidel (EDTA). Standardizovaná metoda postupné extrakce, tzv. metoda BCR, zahrnuje použití následujících činidel [3]:

- $0,11 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ v poměru 1 : 50 (w/v)
- $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ v poměru 1 : 50 (w/v), pH = 2
- $8,8 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ v poměru 1 : 20 (w/v), po odpaření do sucha na teflonové horké desce při teplotě 80°C následuje $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$ v poměru 1 : 50 (w/v), pH = 2

Každému z výše uvedených činidel je vzorek vystaven po dobu 16 hodin. Tímto postupem tedy získáme 4 frakce F1-F4, které jsou charakterizovány následujícím způsobem:

- F1 – výměnná frakce
- F2 – frakce vázaná na oxidy
- F3 – frakce vázaná na organické látky a některé sulfidy
- F4 – frakce reziduální (podíly prvků pevně vázaných v krystalických mřížkách, pro její rozložení je třeba použít některou z metod celkového rozkladu vzorku)

4.2.1 Aplikace metod chemické frakcionace na ovzduší

Z hlediska environmentální či toxikologické analýzy jsou významnou součástí ovzduší prachové částice, které vznikají přírodními (vulkanická činnost), ale především antropogenními procesy (průmyslová činnost). Tyto částice mohou být nositeli řady toxických látek. Prvním parametrem, podle kterého mohou být prachové částice frakcionovány, je jejich velikost. Tento parametr je velmi významný z toxikologického hlediska, protože ovlivňuje dobu setrvání částic v ovzduší, případně možnost jejich proniknutí do plicních sklípků po vdechnutí. V tomto ohledu představují problém především částice menší než 1 μm [3], které setrvávají v ovzduší déle, než částice větší, a pronikají hluboko do plic.

Mezi zdraví škodlivé prvky patří především : As, Be, Cd, Cl, Co, Cr, F, Hg, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Th, U.

Při aplikaci frakcionace na ovzduší by mělo být dodrženo několik obecných zásad [3].

1. Volit co nejmenší počet kroků
2. Kontrolovat kontaminace v každém kroku
3. Zvolená metoda musí umožnit odlišit složky zachycené na částicích prašných aerosolů od těch zabudovaných pevně v matici
4. Volit dostatečně selektivní činidla s vysokou extrakční účinností
5. Výběr extrakčního činidla se řídí povahou analytu, sledovanou chemickou formou a charakterem matrice, ze které se sloučenina extrahuje
6. Účinnost extrakčního činidla je ovlivněna jeho koncentrací, pH prostředí, poměrem kapalina/pevný vzorek, způsoby třepání a míchání a dobou trvání extrakce
7. Chemické vlastnosti extrakčního činidla ovlivňují jeho selektivitu
8. Nutno testovat vliv dalších parametrů ovlivňujících extrakční proces
9. Volit dostatečně citlivé metody stanovení s ohledem na odběry prašných aerosolů na filtry a jejich nízké navážky
10. Nutno stanovovat i totální obsahy analytů z důvodu určení hmotnostní bilance

4.3 Chrom a význam jeho speciace

Chrom je kovový prvek vyskytující se v oxidačních stavech -II až VI [4]. Nalezneme ho v půdách, vodách, horninách, v sopečném prachu a plynu, ale i v rostlinných a živočišných tkáních. Jeho zdrojem je především lidská činnost. Do životního prostředí se chrom dostává z různých průmyslových odvětví – kožedělní průmysl, výroba barviv, metalurgie a doprava. Stejně jako ostatní kovy ani chrom není biologicky odbouratelný, proto má jeho stanovení velký význam v environmentálních analýzách [5]. Analyticky významné jsou sloučeniny obsahující chrom s oxidačním číslem III a VI, které jsou nejstabilnější a vyskytují se nejhojněji.

Rozlišení jednotlivých forem Cr při jeho stanovení je důležité vzhledem k jejich rozdílné toxicitě. Kromě šestimocného chromu jsou ostatní formy považovány za netoxické [6]. Celková toxicita chromu je odhadována na základě přítomnosti jeho jednotlivých chemických forem (Cr(VI) je přibližně 100krát toxičtější než Cr(III)) [7].

Kovový chrom (Cr(0)) se nachází hlavně ve slitinách (nerezová ocel), ale také v pochromovaných předmětech. Je hlavní přísadou zajišťující slitinám nebo materiálům nové vlastnosti - odolnost vůči korozi, opotřebování, teplotě a rozkladu. Podobně zlepšuje tvrdost, tvarovou i chemickou stálost, hygienu a barvu.

Trojmocný chrom je esenciálním prvkem, který je součástí enzymů podílejících se na metabolismu cukrů, mastných kyselin a bílkovin [4,5,8-14]. V přírodních vodách se vyskytuje ve formě iontu $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{OH}^+$ a v různých komplexech.

Šestimocný chrom vyskytující se ve formě CrO_3 nebo v závislosti na pH prostředí ve formě iontů CrO_4^{2-} , HCrO_4^- a $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ je toxikologicky nejvýznamnější. Důvodem jsou jeho hepatotoxické, nefrotoxické, karcinogenní a teratogenní účinky na organismy [5,9, 15-18]. Do buněk se dostává difúzí přes buněčnou membránu. Karcinogenita je důsledkem vzniku reaktivních forem kyslíku (superoxid, hydroxylový radikál) během detoxikačních metabolických přeměn Cr(VI) na Cr(III) přes Cr(V a IV). Reaktivní formy kyslíku mohou poškozovat DNA, protein p53 regulující apoptózu a také přispívají k poškození erytrocytů vedoucí k anémii [19].

U.S. Environmental Protection Agency (EPA) klasifikuje Cr(VI) jako inhalační karcinogen [20]. Významná je inhalační expozice CrO_3 zaměstnanců průmyslu. Při pokusech na krysách byl stanoven NOAEL (no observable adverse effect level) inhalační expozice Cr(VI) na $0,2 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ [19].

Pro výskyt Cr v pitné vodě byly EPA stanoveny limity $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ [4,9]. Limity pro odpadní vody jsou $0,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro celkový obsah chromu a $0,05 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro Cr(VI).

4.4 Atomová emisní spektrometrie

Atomová emisní spektrometrie je metodou, jejíž začátky spadají do 60. let 19. století [21]. Její další rozvoj probíhal od dvacátých let 20. století až do dnešní doby, kdy se vývoj zaměřuje na zlepšování zdrojů excitační energie. Jednou z výhod této metody je možnost využití pro souběžnou analýzu více prvků najednou.

Principem metody je detekce záření emitovaného atomy vzorku. Vzorek je nejprve dodáním energie převeden do atomárního excitovaného stavu. Při návratu do základního energetického stavu emituje vzorek polychromatické, ale nespojité záření, které lze využít k získání kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Energie emitovaného záření odpovídá rozdílu energií hladin, mezi kterými se pohybuje excitovaný elektron. Lze ji vyjádřit vztahem

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu \quad (4.1)$$

kde E_2 je energie excitovaného stavu, E_1 energie základního stavu, h je Planckova konstanta [$6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s], ν je frekvence emitovaného záření.

Spektrální složení emitovaného záření je typické pro dané prvky. Podle vlnové délky jednotlivých čar lze tedy určit, o jaký prvek se jedná.

Intenzita záření je pak přímo úměrná množství analytu ve vzorku. Pro kvantitativní hodnocení se využívá tento vztah

$$\log \Phi_\lambda = b \cdot \log c + \log a \quad (4.2)$$

kde Φ_λ je hustota zářivého toku vlnové délky λ příslušející danému prvku, c je koncentrace prvku ve vzorku, konstanty a a b souvisejí s experimentálními podmínkami.

Atomový emisní spektrometr se skládá z následujících částí: budící zdroj, optický systém, detektor, počítač.

Budící zdroj je ta část přístroje, kam je zaváděn vzorek, který je posléze, zahřátím na několik tisíc stupňů Celsia, převeden do excitovaného atomárního stavu. Zavedení vzorku může být uskutečněno několika způsoby: pomocí nebulizéru, elektrod, metodou generování hydridů nebo laserovou ablací (využití pro pevné vzorky). Samotnou excitaci je možné realizovat také několika způsoby: pomocí plamene, elektrického výboje, plazmy nebo laseru. Podrobněji bych se zmínila pouze o plazmových zdrojích, protože jsou v současné době jediným v praxi používaným způsobem excitace.

Plazma je nejčastěji definována jako vysoce ionizovaný plyn tj. z více než jednoho procenta. Je elektricky vodivá, ale navenek nevykazuje žádný náboj. Získat ji lze pomocí elektrického výboje v plazmovém plynu (nejčastěji argon). Podle způsobu jakým je el. výboj proveden rozlišujeme stejnosměrnou plazmu (DCP), mikrovlnně indukovanou (MIP) a indukčně vázanou plazmu (ICP).

Stejnosměrná plazma (DCP) vzniká průchodem konstantního proudu plazmovým plynem mezi elektrodami. Mez detekce stanovení využívající DCP ale není příliš dobrá.

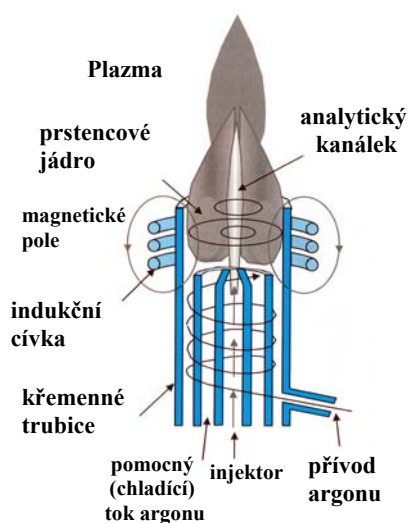
Mikrovlnně indukovaná plazma (MIP) vzniká dodáním energie z mikrovlnného zdroje. Tuto metodu lze použít i pro stanovení nekovových prvků.

Indukčně vázaná plazma (ICP) vzniká indukčním přenosem vysokofrekvenční energie z budícího vysokofrekvenčního generátoru cívkou.

4.4.1 Indukčně vázaná plazma

Hlavní částí přístroje, který využívá ICP, je plazmová hlavice (obr. 4.2). Hlavice je tvořena třemi koaxiálními křemennými trubicemi. Vnitřní slouží pro přívod vzorku, střední pro přívod plazmového plynu (Ar) a vnější pro chladicí plyn (Ar nebo N₂).

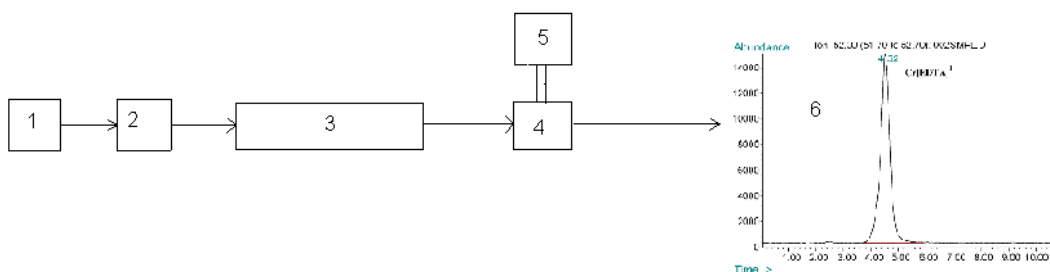
Kolem křemenné trubice s plazmovým plynem vzniká elektromagnetické pole urychlující elektrony, které svoji energii předávají atomům argonu, který se zahřívá a ionizuje. V tomto zdroji převažuje excitace nárazem částic. Výhodou je např. menší intenzita pozadí než v oblouku či jiskře.



Obr. 4.2: Plazmová hlavice ICP-AES spektrometru

4.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, která se vyvinula v 70. letech 20. století. Vysokých účinností se dosahuje použitím stacionárních fází tvořených malými částicemi homogenně vyplňujícími kolonu. Dosahuje se účinností řádově desítek tisíc pater na metr délky kolony. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem. Dávkuje se malé objemy vzorků (desítky mikrolitrů) [22]. HPLC dnes, díky své široké použitelnosti (cca 80% veškerých známých látek lze analyzovat metodou HPLC), patří k nejvíce využívaným analytickým metodám. Její další vývoj směřuje k celkové miniaturizaci. Blokové schéma přístroje ukazuje následující obrázek [23].



Obr. 4.3: Blokové schéma chromatografu

1 – zdroj mobilní fáze, 2 – zařízení pro vstřik vzorku, 3 – kolona, 4 – detektor, 5 – zařízení pro zpracování signálu detektoru, 6 – výsledný chromatogram

Proces separace probíhá v koloně, kterou vyplňuje stacionární a mobilní fáze. Různé analyty rozdílně interagují se stacionární fází a zadržují se v koloně po různě dlouhou dobu. Proces separace je ale výrazně ovlivněn i složením fáze mobilní. Nezanedbatelné jsou i další experimentální podmínky jako teplota nebo průtok mobilní fáze. Účinnost chromatografického dělení je kvantifikována pomocí počtu teoretických pater, případně jeho výškového ekvivalentu pokud chceme porovnávat kolony různé délky.

Vztah mezi průtokovou rychlostí mobilní fáze a výškou teoretického patra popisuje van Deemterova rovnice:

$$H = A + B/u + C \cdot u \quad (4.3)$$

kde A , B a C charakterizují příčiny rozšiřování zón, u je průtoková rychlost mobilní fáze, H je výška teoretického patra.

Dokonalost rozdělení sousedních analytů popisuje veličina rozlišení, kterou lze vypočítat podle následujícího vztahu:

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j} \quad (4.4)$$

Kde R je rozlišení, Δt_R je rozdíl retenčních časů jednotlivých analytů, $w_{i(j)}$ je šířka píku při základně.

Ideální hodnota je $R = 1,5$.

Pro potřeby speciální analýzy se používá iontově výměnná chromatografie (IEC) a chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC) [2].

4.5.1 Mobilní fáze v HPLC

Jak bylo řečeno výše, mobilní fáze se významně podílí na separačním procesu. Změnou jejího složení lze snadno ovlivnit výsledek separace. Jejími nejdůležitějšími charakteristikami jsou polarita a selektivita. Vlastnosti mobilní fáze jsou důležité i z hlediska detekce. Měla by dávat v detektoru minimální signál, a tím umožňovat co nejcitlivější detekci. Viskozita, stlačitelnost a toxicita by měly být co nejnižší.

4.5.2 Stacionární fáze v HPLC

Stacionární fáze vyplňuje objem kolony a spolu s mobilní fází vytváří prostředí pro separaci látek. Z hlediska stacionární fáze lze kolony rozdělit na náplňové a monolitické. Monolitické kolony jsou zcela vyplněny organickým nebo anorganickým polymerem, který vzniká polymerační reakcí přímo v koloně. I přes některé výhody monolitických kolon, jako je velká mechanická stabilita, přesně definovaná velikost pórů nebo velká účinnost separace i při vysokých průtocích mobilní fáze, zůstávají náplňové kolony v praxi používanější. Účinnost separace náplňových kolon je dána především velikostí a uspořádáním částic. Dále lze stacionární fázi hodnotit podle velikosti částic a podle použitého materiálu, např. jeho polarity. Výběr stacionární fáze se odvíjí od principu, kterým má dojít k separaci analytů. K dělení může docházet na základě adsorpce, na základě rozdílné rozpustnosti, iontové výměny nebo síťového efektu. V této práci byla použita iontově výměnná chromatografie, proto se v další části budu věnovat tomuto principu.

4.5.3 Iontově výměnná chromatografie

Tento typ kapalinové chromatografie lze použít pro separaci látek iontové povahy (silné, slabé elektrolyty). Principem dělení je interakce iontů analytu s nabitými funkčními skupinami stacionární fáze. Podle použité stacionární fáze, na jejímž povrchu jsou vázány iontově výměnné skupiny, lze dělit kladně nebo záporně nabitě ionty. Jako měniče kationtů (katexy) se nejčastěji používají karboxylové skupiny ($-\text{COOH}$) a sulfoskupiny ($-\text{SO}_3\text{H}$). Jako měniče aniontů (anexy) lze použít aminoskupiny ($-\text{NH}_2$) nebo tetraalkylamoniové ($-\text{N}^+(\text{R})_3$) skupiny. Při výměně iontů se uplatňují elektrostatické síly, které jsou ovlivňovány velikostí, nábojem, koncentrací iontů, iontovou silou mobilní fáze a relativní permitivitou prostředí. Katexy i anexy se široce používají pro dělení iontů kovů (Cr, As, Se), použití je možné např. i pro analýzu sérových proteinů.

4.6 Statistické zpracování výsledků

4.6.1 Měření

Při měření vyjadřujeme kvantitativně, tj. číselnou formou a v určitých jednotkách, úroveň jisté kardinální veličiny, která charakterizuje vlastnost daného systému. Hodnota naměřené veličiny může sama o sobě představovat požadovanou informaci. Častější je však případ, kdy je nutno tuto veličinu definovaným způsobem na požadovanou informaci převést. Obvykle se hodnota požadované veličiny vypočítává ze souboru výsledků různých měření [24].

4.6.2 Citlivost

V této práci je citlivost vyjadřována jako směrnice kalibrační přímky, kterou lze popsat vztahem:

$$k = dy/dx \quad (4.5)$$

kde y je odezva a x měřená veličina.

Citlivost stanovení může být posuzována také podle hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti.

4.6.3 Šum

Šum oscilující kolem základní linie je charakterizován frekvencí a amplitudou. Při měření můžeme rozlišit několik druhů šumu. Jako tzv. bílý šum se označuje šum, jehož součet pozitivních a negativních výchylek je roven nule. Pokud je součet nenulový, jedná se o tzv. náhodný šum. Šum jehož součet výchylek vykazuje časovou závislost v následných intervalech se označuje jako drift [25].

4.6.4 Kalibrace

Kalibrace je empirický postup zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Nejčastěji je využívána při stanovení analytu ve vzorku, jehož obsah x_A odpovídá intenzitě naměřeného signálu y . Sestavení kalibrační závislosti se provádí pomocí

standardů, které lze rozdělit na vnější a vnitřní. Vnější standardy jsou samostané vzorky obsahující známé množství analytu. Jejich nejlepší podobou jsou referenční materiály, které svým složením odpovídají reálným vzorkům. Vnitřní standardy se přidávají přímo do analyzovaných vzorků [24].

Získané hodnoty lze vyjádřit pomocí příslušné regresní závislosti. V této práci je využívána jen lineární závislost, která je nejjednodušším případem a lze ji popsat funkcí:

$$y = a + b \cdot x_A \quad (4.6)$$

4.6.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Podle definice IUPAC je mez detekce koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky signálu nulového vzorku. Mez stanovitelnosti poté odpovídá desetinásobku této směrodatné odchylky. Z praktického hlediska mez detekce označuje nejmenší koncentraci analytu ve vzorku, kterou můžeme danou analytickou metodou detekovat. Mez stanovitelnosti označuje nejmenší koncentraci, kterou lze ještě stanovit s přijatelnou přesností [21].

Experimentálně byly tyto parametry pro potřeby této práce stanoveny změřením vzorků, o nízké ale ještě detekovatelné koncentraci analytu, desetkrát co nejtěsněji za sebou. Dále byla sestrojena kalibrační křivka v oboru nízkých koncentrací. Naměřené hodnoty byly pomocí této kalibrační křivky přepočítány na koncentrace. Pro získané hodnoty koncentrací byla vypočítána směrodatná odchylka σ a následně hodnoty 3σ respektive 10σ odpovídající mezi detekce respektive stanovitelnosti.

4.6.6 Opakovatelnost

Opakovatelnost měření je obecně vyjádřena směrodatnou odchylkou výsledků analýz provedených v určité laboratoři na stejném vzorku za stejných podmínek [24]. V této práci je opakovatelnost O vyjadřována jako relativní směrodatná odchylka deseti co nejtěsněji za sebou naměřených hodnot.

$$O(\%) = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} \quad (4.7)$$

kde s je směrodatná odchylka, \bar{x} je průměr naměřených hodnot

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Spektrometr a jeho příslušenství

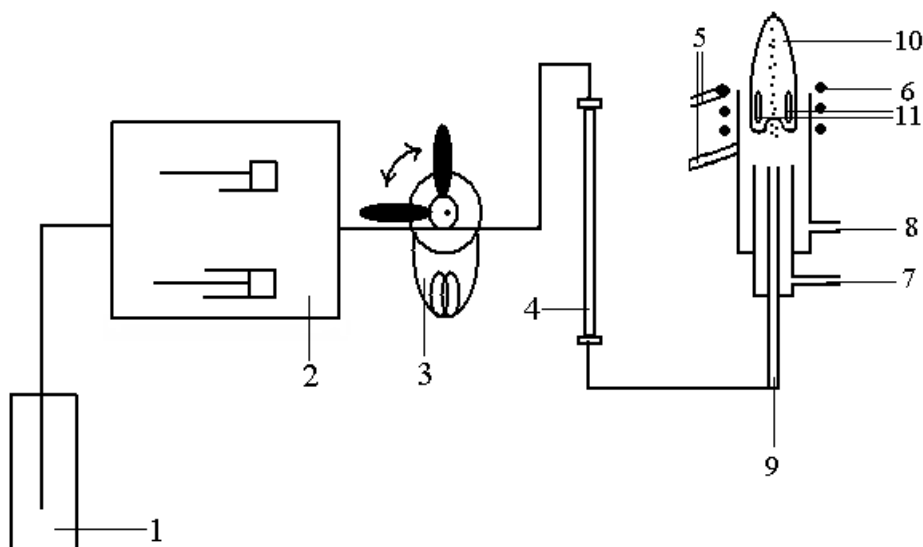
Pro veškerá měření byl použit atomový emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem VISTA-PRO (Varian, Australia). RF příkon 1,2 kW, průtok plazmového plynu 15 l·min⁻¹, průtok argonu zmlžovačem 0,9 l·min⁻¹. Obsah chromu byl simultánně měřen na čarách 205,560 nm, 267,716 nm, 276,653 nm a 283,563 nm.

5.2 Ostatní přístroje a zařízení

Pro chromatografické dělení forem Cr byla během celé práce používána kolona HAMILTON PRP-X100, 250 x 4,6 mm, 5 μm (PEEK) (katalogové číslo: 79181) (Hamilton, USA). Mobilní fáze byla čerpána pomocí HPLC pumpy 2150 (LKB Bromma, Dánsko). Vzorky byly dávkovány ventilem 9725i (PEEK) (Rheodyne, USA) se smyčkami různých objemů (PEEK).

5.3 Používaná aparatura

Pro speciaci forem Cr byla použita kombinovaná technika HPLC s detekcí metodou ICP-AES. Spojení obou metod bylo realizováno přímo pomocí teflonové kapiláry spojující výstup z HPLC kolony a vstup do zmlžovače spektrometru. Schéma aparatury znázorňuje obrázek 5.1.



Obr. 5.1: schéma spojení techniky HPLC a ICP-AES

1 – nádoba na mobilní fázi, 2 – HPLC pumpa, 3 – dávkovací ventil se smyčkou, 4 – chromatografická kolona, 5 - přívod energie z RF generátoru, 6 – indukční cívka, 7 – plazmový plyn, 8 – chladicí plyn, 9 – injektor pro přívod aerosolu vzorku, 10 – analytická zóna, 11 – plazmový prsten

5.4 Použité chemikálie a reagenty

Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda připravená zařízením Milli Q_{PLUS} firmy Millipore, U.S.A.

Pracovní roztoky Cr(VI) o požadované koncentraci byly připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, který byl připraven z pevného $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Lachema, Brno).

Pracovní roztoky Cr(III) o požadované koncentraci byly připraveny ředěním zásobního roztoku (substance CrCl_3) o koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Analytika, Praha).

Pro přípravu vyluhovacích činidel byly použity následující chemikálie:

- CH_3COOH 99%, p.a. (Lachema, Neratovice)
- $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, G.R. (Merck, Německo)
- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice)
- Na_2CO_3 , p.a. (Lachema, Neratovice)
- NaOH , p.a. (Lachema, Neratovice)

Pro přípravu mobilních fází (pufrů) byly použity tyto chemikálie:

- NaClO_4 , p.a. (Lachema, Brno)
- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice)
- EDTA (Chelaton III), p.a. (Lachema, Brno)
- CDTA (Chelaton IV), G.R. (Merck, Německo)
- HNO_3 , Suprapure (Merck, Německo)
- CH_3OH (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice)

6 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

6.1 OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY SEPARACE

Prvním úkolem diplomové práce bylo zjistit optimální separační podmínky s danou separační kolonou s navázaným anexem Hamilton PRP X100, 250 x 4,6 mm, 5 μm (PEEK). Pozornost byla věnována především používané mobilní fázi, ale také přípravě a dávkování vzorků.

Při proměřování optimálních separačních podmínek bylo vycházeno z výsledků diplomové práce vypracované v roce 2008 [23], ve které byla používána kolona SUPELCOSILTM LC-SAXI, 250 x 4,6 mm, 5 μm (Supelco, USA). Tato kolona však vykazovala velmi špatné separační schopnosti.

Prvkově specifický detektor – ICP-AES byl standardně nastaven (optimální podmínky) pro kontinuální měření obsahu chromu v požadovaném časovém intervalu. Měření hodnot intenzity bylo synchronně spouštěno s nadávkováním vzorku Cr na kolonu.

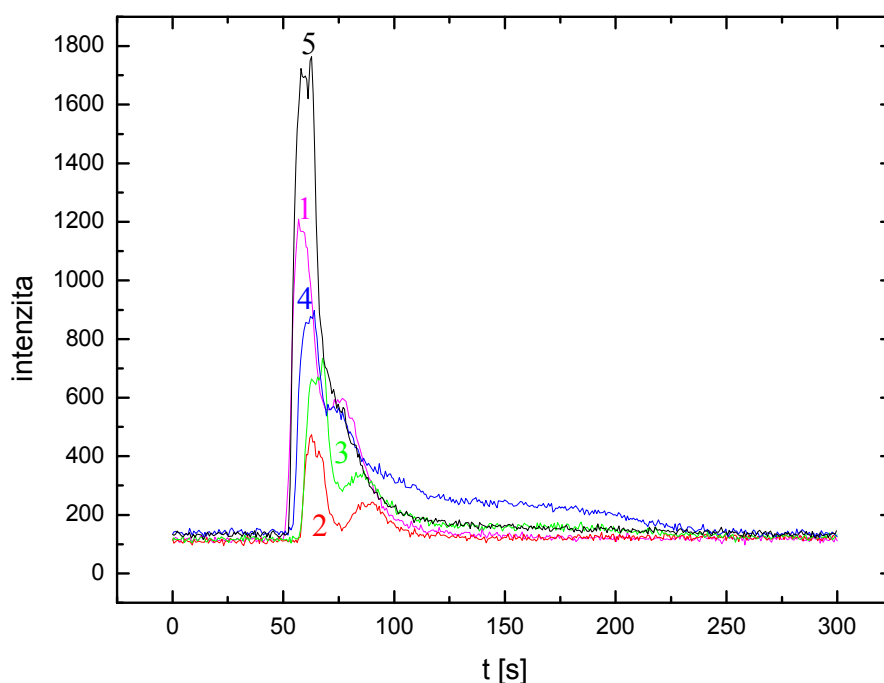
Ve všech případech byl jako kritérium pro hodnocení optimálních pracovních podmínek zvolen signál chromu odečítaný v maximu chromatografického píku (výška píku). Plocha píku byla hodnocena pouze v případě proměřování kalibračních závislostí; ovládací software ICP spektrometru normálně neumožňuje vyhodnotit plochu píku.

6.1.1 Složení mobilní fáze

Jedním ze základních experimentálních parametrů v chromatografii, který je třeba optimalizovat, je složení používané mobilní fáze. Na základě výsledků předchozí diplomové práce byla jako optimální zvolena mobilní fáze obsahující pufr o daném pH a anorganickou sůl pro zvýšení iontové síly. Mobilní fáze měla složení: 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaClO_4 , pH 7.

Důležitou součástí mobilní fáze pro speciaci obou anorganických forem Cr musí být také přídavek komplexotvorného činidla, které váže Cr(III) iont do záporně nabitého komplexu vhodného pro separaci na anexové koloně. Pro potřeby této práce bylo vyzkoušeno několik mobilních fází lišících se druhem (EDTA, CDTA) a koncentrací komplexotvorného činidla. Měření bylo prováděno se vzorky obsahujícími 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CDTA.

Získané chromatogramy jsou znázorněny na obr. 6.1. Pro další měření byla nakonec vybrána mobilní fáze bez přídavku komplexotvorného činidla. V tomto případě bylo dosaženo maximální citlivosti a nedocházelo k rozdělování píku Cr(III). K převedení iontu Cr(III) do komplexu stačí přídavek komplexotvorného činidla přímo do vzorku (vzorky s přídavkem komplexačního činidla byly na 30 minut vloženy do vodní lázně s teplotou 80°C a po ochlazení teprve proměřovány). S použitím této mobilní fáze došlo zároveň k prodloužení retenčního času Cr(VI) o cca 120 s.

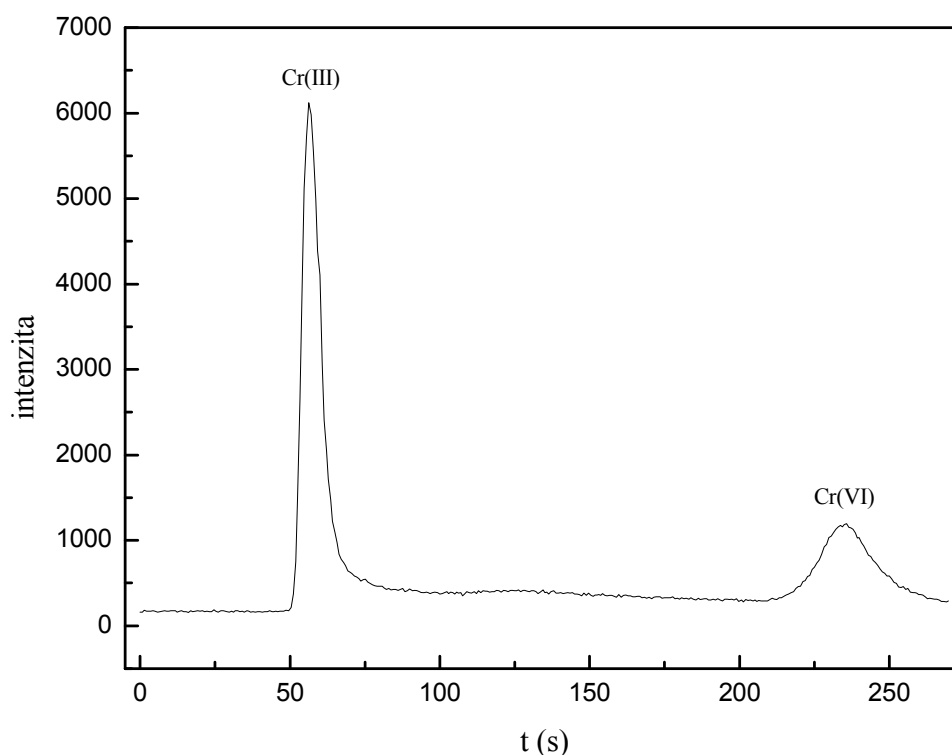


Obr. 6.1: Vliv složení mobilní fáze na signál Cr(III)

Podmínky měření: MF: 1 – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, 1 mmol·l⁻¹ CDTA, pH 7, 2 – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, 2 mmol·l⁻¹ CDTA, pH 7, 3 – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, 2 mmol·l⁻¹ EDTA, pH 7, 4 – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, 5 mmol·l⁻¹ EDTA, pH 7, 5 – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, pH 7

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, 200 μl

Dalším parametrem, který byl během optimalizačních experimentů měněn, byla koncentrace anorganického pufru $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v mobilní fázi. Byla proměřena závislost v koncentračním rozsahu $10 - 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. I když koncentrace $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ vykazovala vyhovující separaci obou forem v kratším čase, byla nakonec koncentrace pufru snížena na hodnotu $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. To vedlo k prodloužení separace. Příklad získaného chromatogramu je uveden na obrázku 6.2.



Obr. 6.2: Separace směsi Cr(VI) a Cr(III)

$5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{Cr(VI)} + 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{Cr(III)} + 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{CDTA}$

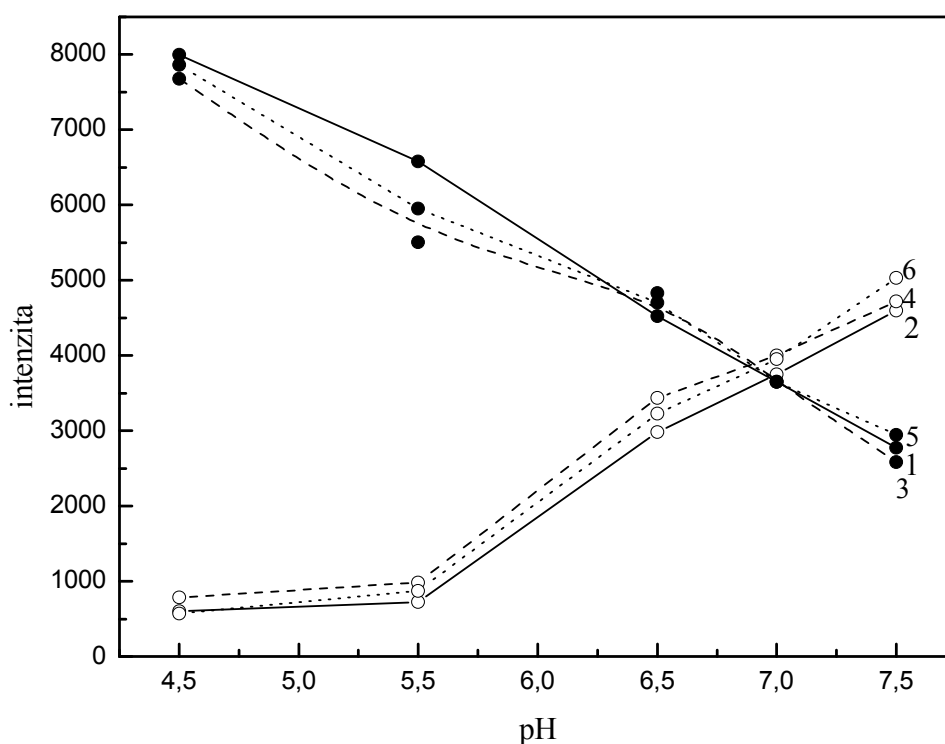
Podmínky měření: $\text{MF} = 50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NaClO}_4$, $\text{pH}_{\text{MF}} 5,5$

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

Důvody k této změně byly čistě technického rázu. S vyšší koncentrací pufru docházelo k výraznému zvýšení tlaku v aparatuře a na jedné straně k opakovanému přiucpání spojovacích kapilár, na druhé pak k podtékání mobilní fáze přímo ve vysokotlakém čerpadle. Oboje pak vždy vedlo k přerušení analýzy. Na výsledek separace neměla tato změna vliv (kromě prodloužení vlastní analýzy).

6.1.2 pH mobilní fáze

Hodnota pH mobilní fáze neměla zásadní vliv na separaci obou forem Cr. Optimální hodnota pH mobilní fáze byla tedy vybírána s ohledem na shodu poměru intenzit píků a nadávkovaného množství Cr(III) a Cr(VI). Sledován byl rozsah pH 4,5 - 7,5. Proměřeny byly vzorky s koncentrací iontů Cr(III) nebo Cr(VI) $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a s nebo bez přidavku komplexotvorného činidla, kterým byla CDTA nebo EDTA o koncentraci $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Celkem bylo tedy proměřeno šest vzorků pro každou hodnotu pH.



Obr. 6.3: Vliv pH mobilní fáze na signál Cr(VI) a Cr(III)

1 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III), 2 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI), 3 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + EDTA, 4 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI)+EDTA, 5 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + CDTA, 6 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + CDTA

Podmínky měření: MF= $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaClO_4

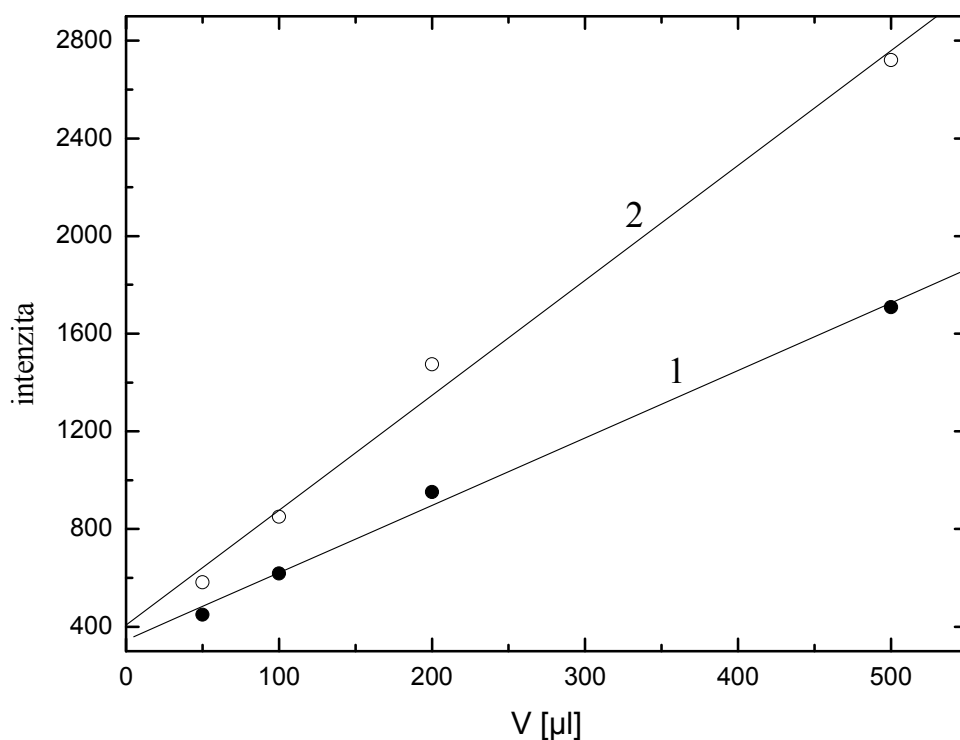
$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

Jak je patrné z obr. 6.3, odezva Cr(VI) se zvyšujícím se pH roste, odezva Cr(III) naopak klesá. Přídavek komplexačního činidla neměl na tento trend vliv. Pro další měření

byla vybrána hodnota pH mobilní fáze 7, při které dochází k protnutí křivek. Na požadovanou hodnotu bylo pH mobilní fáze upravováno přidávkem roztoku NaOH.

6.1.3 Dávkovaný objem

Důležitým parametrem je také objem vzorku dávkovaný na kolonu, který je řízen velikostí dávkovací smyčky. Z obr. 6.4 zobrazujícího závislost intenzity signálu na dávkovaném objemu je patrné, že se zvětšujícím se objemem odezva lineárně roste. Pro další měření byl jako dostatečný zvolen objem 200 μl .



Obr. 6.4: Vliv dávkovaného objemu na signál Cr(III) a Cr(VI)

1 - Cr(III), 2 - Cr(VI)

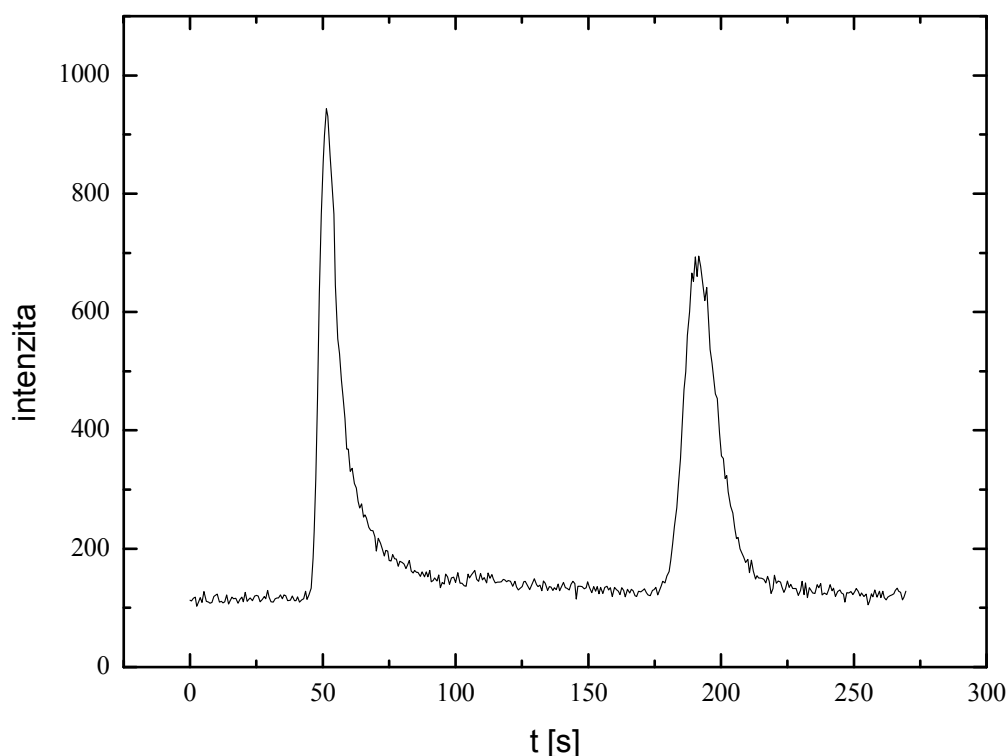
Podmínky měření: MF – 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaClO_4 , pH 7

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$.

Vzorky: 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CDTA

6.1.4 Vliv přídavku komplexotvorného činidla přidávaného ke vzorku

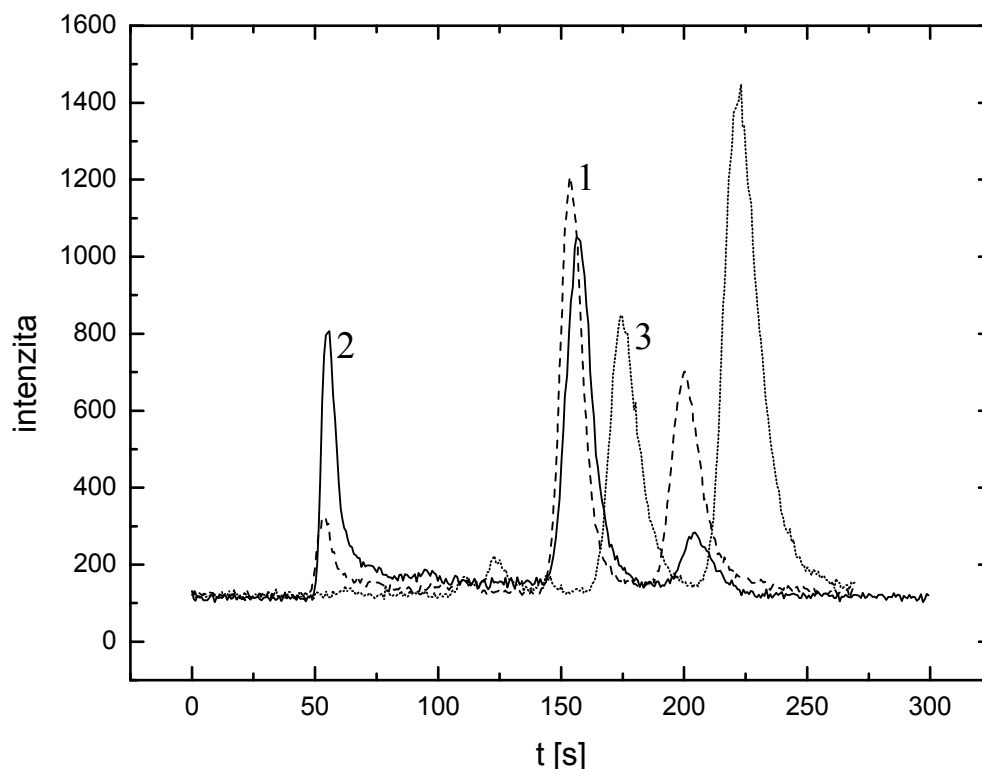
Pro separaci Cr(III) a Cr(VI) byla použita kolona s navázaným anexem jako stacionární fáze. To znamená, že pro interakci analytu se stacionární fází je nezbytné, aby tento byl ve formě aniontů. Pro stanovení Cr(VI), které byly v podobě dichromanových aniontů, to nepředstavuje žádný problém, nicméně ionty Cr(III), které pocházely z roztoku chloridu, musí být pro stanovení převedeny na záporně nabitý komplex. K tomu účelu byla vyzkoušena dvě komplexotvorná činidla: EDTA (Chelaton III) a CDTA (Chelaton VI). EDTA se ukázala jako nevhodná, protože způsobovala na chromatogramu vznik dvou píků odpovídajících pravděpodobně zreagovanému a nezreagovanému podílu chromitých iontů. Získaný signál navíc nebyl stabilní v čase. Výsledky měření vzorků s obsahem EDTA ukazuje následující obr. 6.5. Úplná komplexace s EDTA zřejmě vyžaduje neúměrně dlouhý časový úsek pro zreagování (i v případě zahřátí vzorku) [26].



Obr. 6.5: Chromatogram roztoku $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDTA

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaClO_4 , pH 7

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$



Obr. 6.6: Změna signálu vzorků s přidavkem EDTA v čase

1 – nově připravený roztok, 2 – den starý roztok, 3 – 14 dní starý roztok

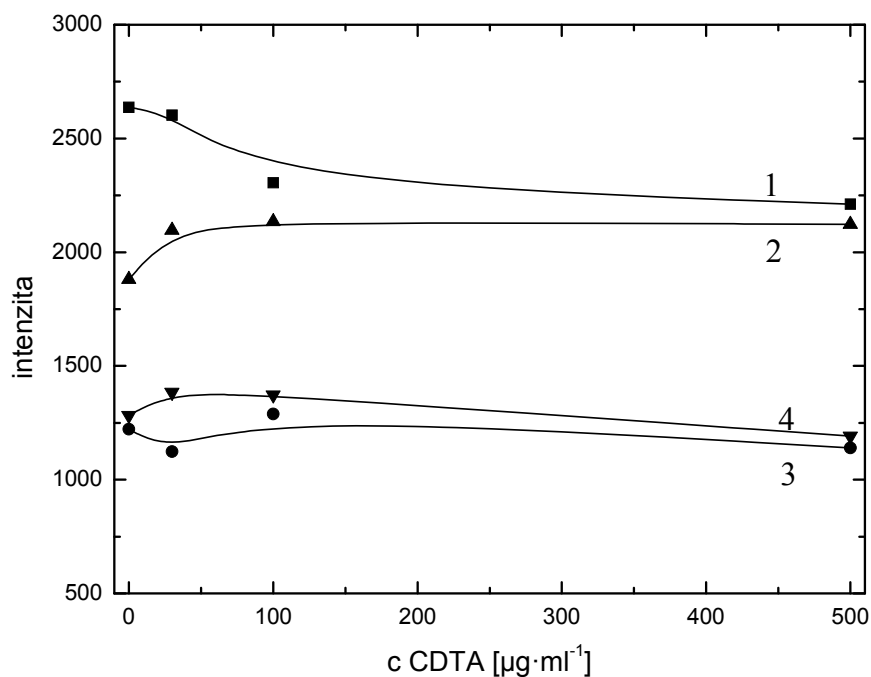
Podmínky měření: MF – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, pH 7

Q_{MF} = 1,5 ml·min⁻¹, λ = 205,560 nm, 200 μl.

Vzorky: 5 μg·ml⁻¹ Cr(III) + 5 μg·ml⁻¹ Cr(VI) + 30 μg·ml⁻¹ EDTA

Lepších výsledků bylo dosaženo s použitím CDTA jako komplexotvorného činidla. S tímto činidlem nedocházelo ke vzniku dalších píků.

V dalším měření byl tedy sledován vliv koncentrace činidla na odezvu obou forem chromu. Měřeny byly vzorky obsahující pouze 5 μg·ml⁻¹ Cr(III) nebo Cr(VI) a vzorky obsahující směs 5 μg·ml⁻¹ Cr(III) a Cr(VI), do vzorků byla přidávána CDTA v koncentračním rozsahu 0 - 500 μg·ml⁻¹. Z obr. 6.7 zachycujícího získané výsledky je patrné, že koncentrace CDTA nemá vliv na citlivost stanovení ani jedné z forem Cr a to ani ať se jedná o vzorky s obsahem jen jednoho nebo obou iontů chromu.



Obr. 6.7: Vliv koncentrace CDTA na signál Cr(III) a Cr(VI)

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaClO_4 , pH 7

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

Vzorky: 1 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + příslušné množství CDTA, 2 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + příslušné množství CDTA (pík Cr(III)), 3 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + příslušné množství CDTA, 4 - $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + příslušné množství CDTA (pík Cr(VI))

K zjištění stability odezvy v čase byly vzorky proměřeny s prodlevou jednoho týdne. Získané výsledky byly shodné s prvním měřením

6.1.5 Výsledné shrnutí optimálních podmínek kombinovaného stanovení

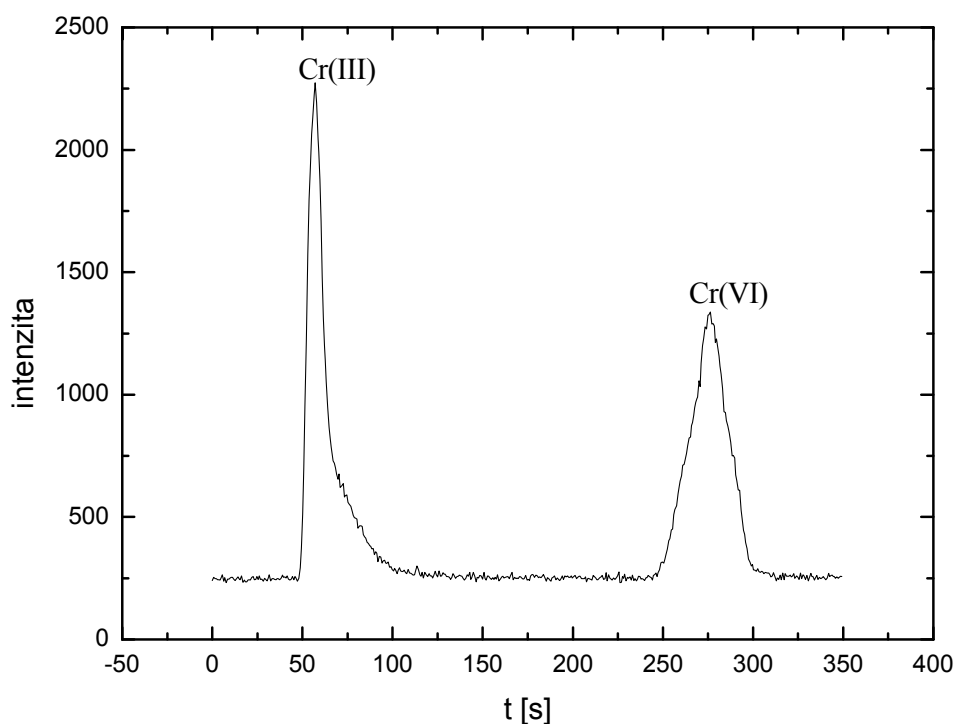
Všechny parametry důležité pro kombinované stanovení přehledně shrnuje tab. 6.1

Tab. 6.1: Optimální podmínky kombinovaného stanovení

Parametr	Hodnota
Sledovaná vlnová délka [nm]	205,560
Složení mobilní fáze	50 mmol·l ⁻¹ CH ₃ COOH, 10 mmol·l ⁻¹ NaClO ₄
pH mobilní fáze	7,0
Průtoková rychlost mobilní fáze [ml·min ⁻¹]	1,5
Dávkovaný objem vzorku [μl]	200
Komplexotvorné činidlo	CDTA

6.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY KOMBINOVANÉ METODY STANOVENÍ OBOU FOREM Cr

Mez detekce, mez stanovitelnosti a opakovatelnost kombinovaného stanovení obou specií chromu byly určeny po proměření kalibračních závislostí pro stanovení obou forem Cr jednotlivě i ve směsi. Měřeny byly roztoky s obsahem jedné nebo obou specií Cr v koncentračním rozsahu 0 - 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro sestavení kalibračních závislostí byla vyhodnocována plocha píků. Při daných experimentálních podmínkách je citlivost stanovení forem Cr ve směsných a jednoduchých vzorcích stejná. Odpovídající jsou i plochy píků příslušející stejným koncentracím Cr(III) a Cr(VI). Jednotlivé formy se tedy vzájemně neovlivňují. Optimální chromatogram a kalibrační přímky ukazuje obr. 6.8 a obr. 6.9.

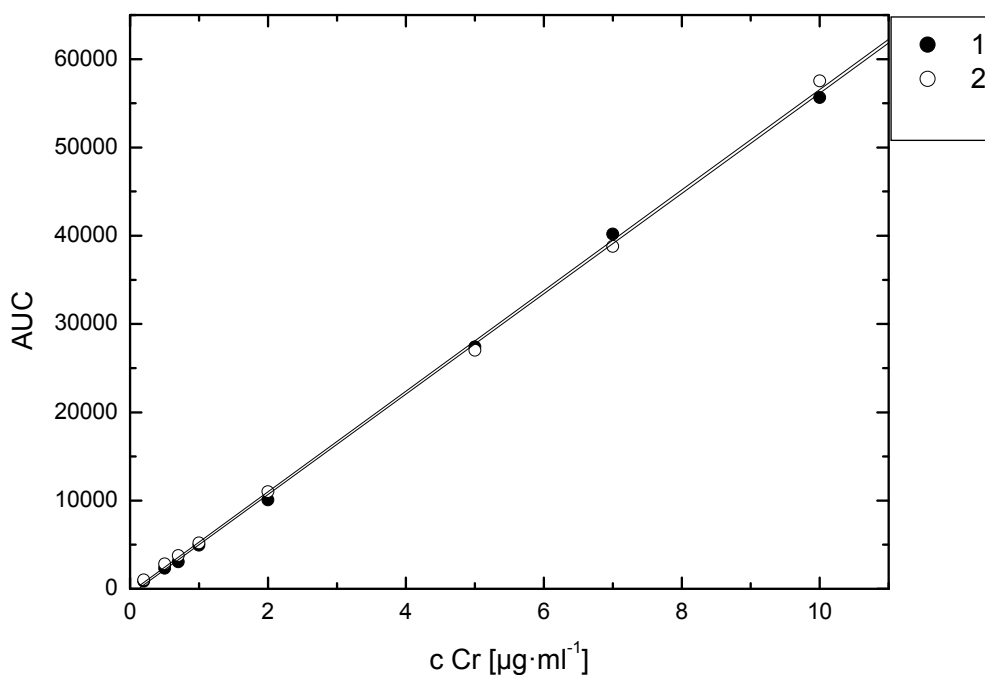


Obr. 6.8: Separace směsi Cr(VI) a Cr(III) na koloně Hamilton PRP X-100

$5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\ \text{Cr(VI)} + 5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\ \text{Cr(III)} + 30\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\ \text{CDTA}$

Podmínky měření: $\text{MF} = 50\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\ \text{CH}_3\text{COONH}_4$, $10\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\ \text{NaClO}_4$, $\text{pH}_{\text{MF}}\ 7$

$Q_{\text{MF}} = 1,5\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560\ \text{nm}$, $200\ \mu\text{l}$



Obr. 6.9: Kalibrační závislost stanovení Cr(III) a Cr(VI)

1 - Cr(III), 2 – Cr(VI); vyhodnocována plocha píku

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

Vzorky: $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ Cr(III)} + 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ CDTA}$, $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ Cr(VI)} + 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ CDTA}$

Opakovatelnost byla určena z výsledků získaných proměřením 10 vzorků obsahujících $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ Cr(VI)}$ nebo Cr(III) a přídavek $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ CDTA}$ co nejtěsněji za sebou.

Získané hodnoty shrnuje tabulka 6.2.

Tab. 6.2: Základní charakteristiky stanovení Cr(III) a Cr(VI) kombinovanou technikou HPLC - ICP AES

	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III) směs	Cr(VI) směs
LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	56	81	49	65
LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	188	259	136	217
Absolutní LOD [μg]*	11	16	10	13
Absolutní LOQ [μg]*	38	52	27	43
Opakovatelnost (% RSD)	6 %	3 %		
Citlivost [$\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	4596	5474	4647	5691
Korelační koeficient	0,987	0,999	0,999	0,999

* dávkováno 200 μl vzorku

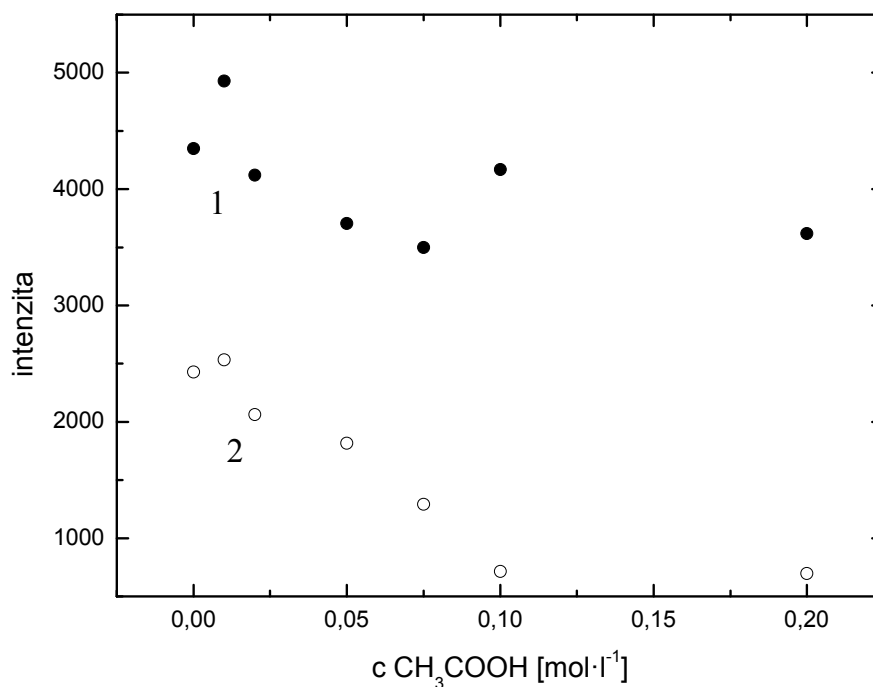
6.3 VLIV VYLUHOVACÍCH ČINIDEL

6.3.1 Kyselá vyluhovací činidla

Jak je uvedeno výše, k přípravě vzorků k analýze podle standardizované metody pro frakcionaci se používají tato vyluhovací činidla: kyselina octová, hydroxylamin, octan amonný. Při použití všech tří vyluhovacích činidel se setkáváme s problémem stability obou anorganických forem chromu, která podstatně znesnadňuje nebo zcela znemožňuje proces speciace. Získané výsledky vypovídající o vlivech uvedených činidel na stabilitu obou forem Cr shrnují následující kapitoly.

6.3.1.1 Kyselina octová (CH_3COOH)

Jako první byla sledována stabilita obou forem Cr v prostředí kyseliny octové. Byla sledována odezva vzorku obsahujícího směs iontů Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na koncentraci kyseliny octové. Vzorky byly měřeny okamžitě po smíchání. Ze získaných výsledků (obr. 6.10) je patrné, že signál Cr(III) je ovlivněn minimálně; oproti tomu signál Cr(VI) s rostoucí koncentrací kyseliny klesá.



Obr. 6.10: Vliv koncentrace CH₃COOH na signál Cr(III) a Cr(VI)

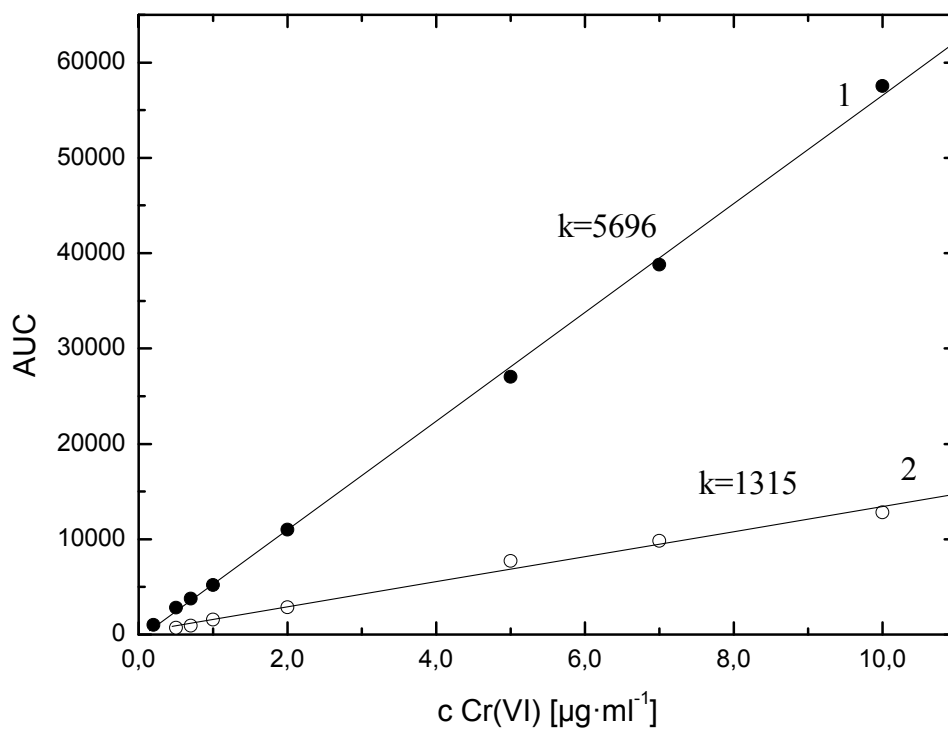
1 - Cr(III), 2 – Cr(VI)

Podmínky měření: MF – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, pH 7

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, 200 μl

Vzorky: 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(III) + 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + 30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ CDTA

Jako další měření, pro které byla vybrána kyselina octová o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹, bylo provedeno porovnání citlivosti stanovení obou forem ve vodě a v prostředí kyseliny octové. Pro měření byly opět použity vzorky obsahující směs iontů Cr(III) a Cr(VI). Z výsledků, které shrnují následující grafy, je patrné, že citlivost stanovení šestimocného chromu výrazně klesá. Tento trend byl potvrzen také proměřením kalibrační řady vzorků obsahujících pouze ionty Cr(VI). Oproti tomu citlivost pro stanovení trojmocného chromu ve směsných vzorcích lehce vzrostla. Tento nárůst citlivosti může být způsoben částečnou redukcí iontů Cr(VI) na Cr(III).



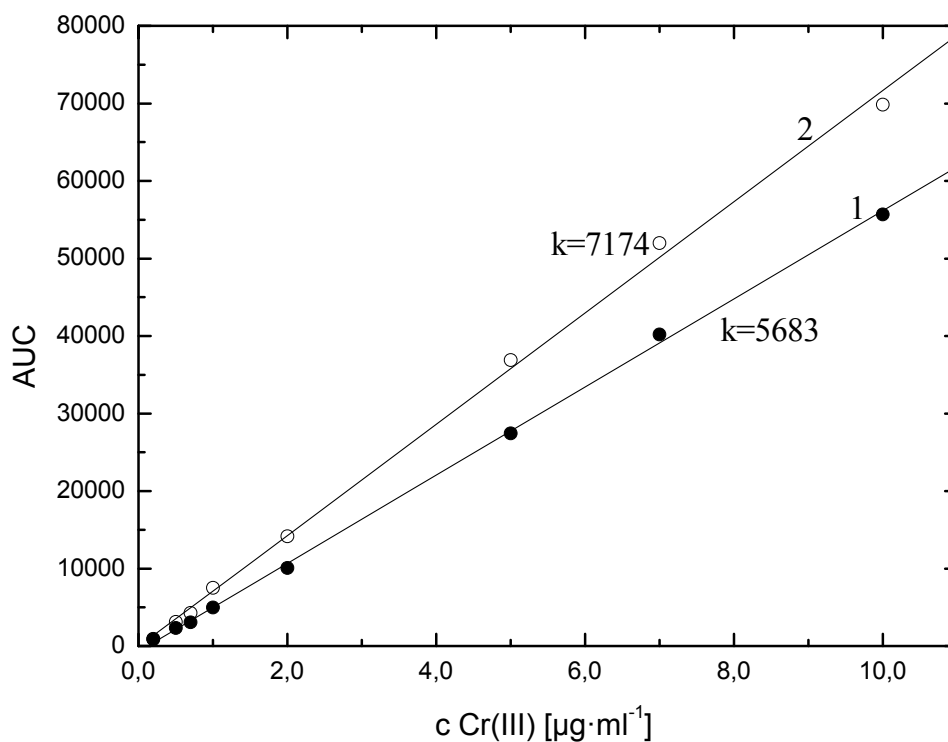
Obr. 6.11: Vliv $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ na citlivost stanovení Cr(VI)

1 - H_2O , 2 - $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

Vzorky: $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ Cr(III)} + 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ Cr(VI)} + 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ CDTA} + \text{H}_2\text{O}$ nebo $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$



Obr. 6.12: Vliv 0,1 mol·l⁻¹ CH₃COOH na citlivost stanovení Cr(III)

1 - H₂O, 2 - 0,1 mol·l⁻¹ CH₃COOH

Podmínky měření: MF – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, pH 7

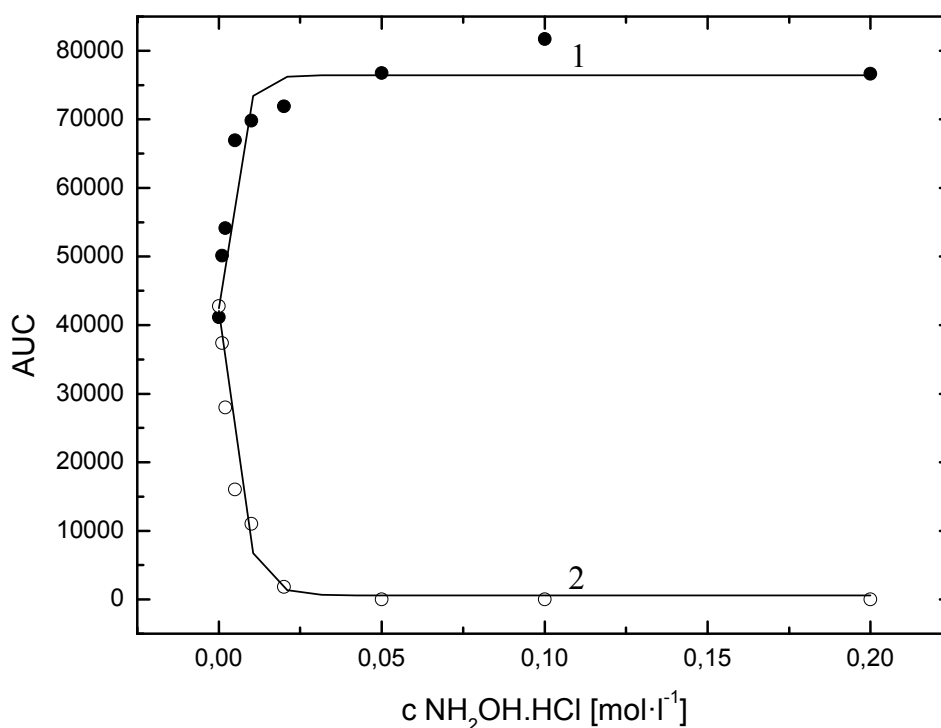
$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, 200 μl

Vzorky: 5 μg·ml⁻¹ Cr(III) + 5 μg·ml⁻¹ Cr(VI) + 30 μg·ml⁻¹ CDTA + H₂O nebo 0,1 mmol·l⁻¹ CH₃COOH

Dalším důsledkem použití 0,1 mol l⁻¹ kyseliny octové je prodloužení retenčního času Cr(VI) zhruba o 40 s.

6.3.1.2 Hydroxylamin ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)

Redukční vlastnosti tohoto činidla jsou nejvýraznější. Při sledování vlivu koncentrace činidla na signál vzorku, který obsahoval směs $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ iontů Cr(III) a $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ iontů Cr(VI) , bylo zjištěno, že koncentrace $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ postačující k úplnému okamžitému převedení iontů chromanových na ionty chromité je $0,05\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. U vzorků analyzovaných týden po jejich přípravě byl veškerý šestimocný chrom přeměněn už nejnižší použitou koncentrací - $0,001\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Průběh závislosti znázorňuje obrázek 6.13.



Obr. 6.13: Vliv koncentrace $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ na signál Cr(III) a Cr(VI)

1 - Cr(III) , 2 - Cr(VI)

Podmínky měření: $M_F - 50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaClO}_4$, $\text{pH } 7$

$Q_{MF} = 1,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560\text{ nm}$, $200\text{ }\mu\text{l}$

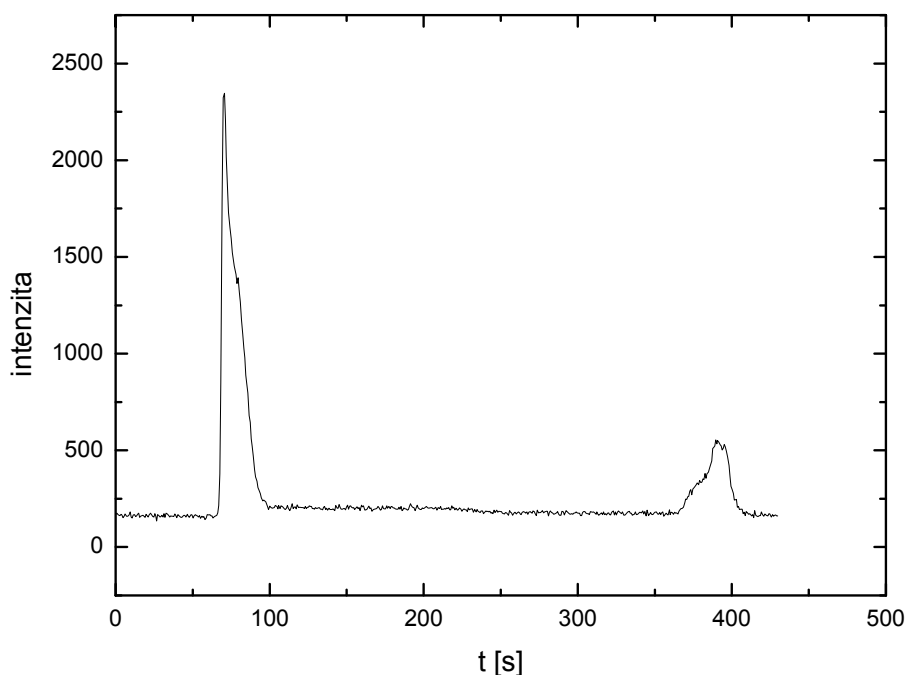
Vzorky: $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{ Cr(III)}$ + $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{ Cr(VI)}$ + $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{ CDTA}$

Z grafu je patrné, že součet signálu odpovídající Cr(III) a Cr(VI) je konstantní. Signál je konstantní i v čase, což bylo ověřeno proměřením roztoků týden po jejich přípravě. Hydroxylamin by byl tedy vhodný ke stanovení celkového obsahu chromu ve vzorku.

6.3.1.3 Octan amonný ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

Jako první pokus s tímto činidlem bylo opět provedeno měření závislosti odezvy směsného vzorku na koncentraci octanu (proměřeny koncentrace 0 – 2,0 mol·l⁻¹). Při tomto měření bylo zjištěno, že při koncentracích do 0,1 mol·l⁻¹ je plocha píků shodná s měřením roztoků bez obsahu octanu. Dochází ale k postupnému prodlužování retenčního času Cr(VI) o cca 30 s (na 310 s). Při koncentracích 0,15 mol·l⁻¹ a 0,2 mol·l⁻¹ je signál tvořen třemi píky s časy cca 70 s, 220 s a 320 s. Při vyšších koncentracích se chromatogram skládal opět ze dvou píků s elučními časy 70 s a 360 - 410 s, docházelo tedy k dalšímu prodlužování retenčních časů obou specií. Dalším zaznamenaným důsledkem použití octanu amonného (o koncentraci vyšší než 0,5 mol·l⁻¹) byl snižující se signál Cr(VI) s rostoucí koncentrací činidla. Pro další měření byl použit roztok $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ o koncentraci 1,0 mol·l⁻¹, což je koncentrace používaná v praxi.

Jako další bylo provedeno měření kalibrační závislosti pro stanovení Cr(VI). Bylo zjištěno, že dochází k jeho částečné přeměně a tvorbě píku s retenčním časem asi 70 s. Druhý pík se objevil v čase 390 s. Získaný chromatogram ukazuje následující obrázek 6.14.



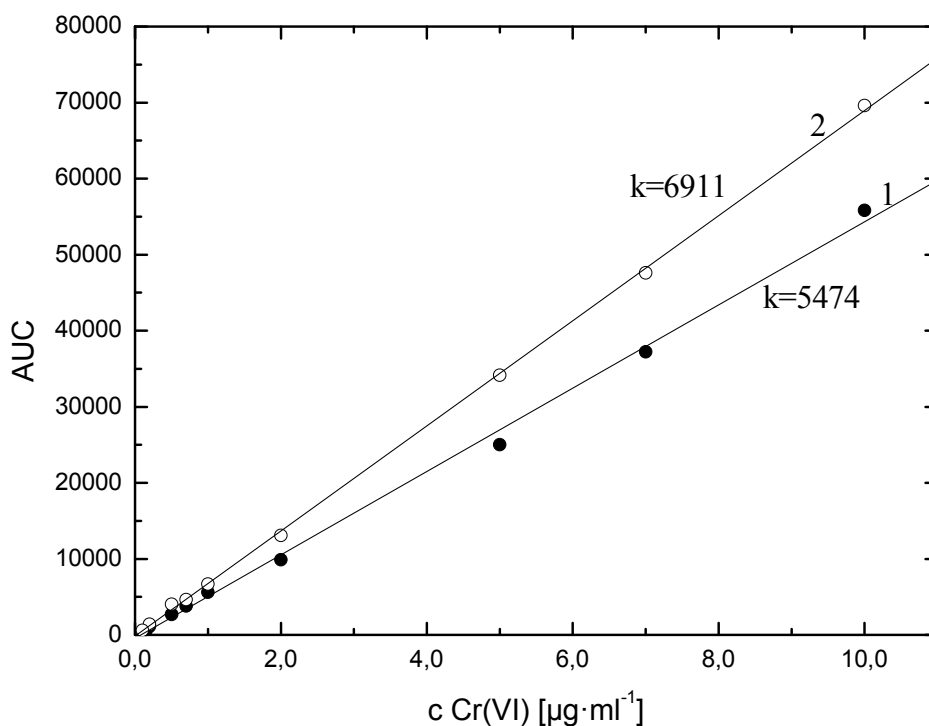
Obr. 6.14: Signál Cr(VI) v prostředí 1 mol·l⁻¹ CH₃COONH₄

Podmínky měření: MF = 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, pH_{MF} 7

Q_{MF} = 1,5 ml·min⁻¹, λ = 205,560 nm, 200 μl

Vzorek: 5 μg·ml⁻¹ Cr(VI) + 30 μg·ml⁻¹ CDTA + 1 mol·l⁻¹ CH₃COONH₄

Následně byla proměřena kalibrační řada vzorků Cr(VI) v prostředí octanu o koncentraci 1,0 mol·l⁻¹. Kalibrační přímka byla sestrojena vynesáním součtu ploch obou píků a porovnána s kalibrační přímkou stanovení Cr(VI) ve vodě. Výsledek je znázorněn na obr. 6.15. Patrný je malý nárůst citlivosti oproti stanovení ve vodě. Nicméně při měření směsných vzorků by tento postup nebylo možné použít, protože jeden z píků splývá s píkem, který odpovídá Cr(III). Efekt použití octanu amonného by tedy byl přesně opačný a došlo by k výraznému snížení citlivosti stanovení Cr(VI).



Obr. 6.15: Vliv $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ CH}_3\text{COONH}_4$ na citlivost stanovení Cr(VI)

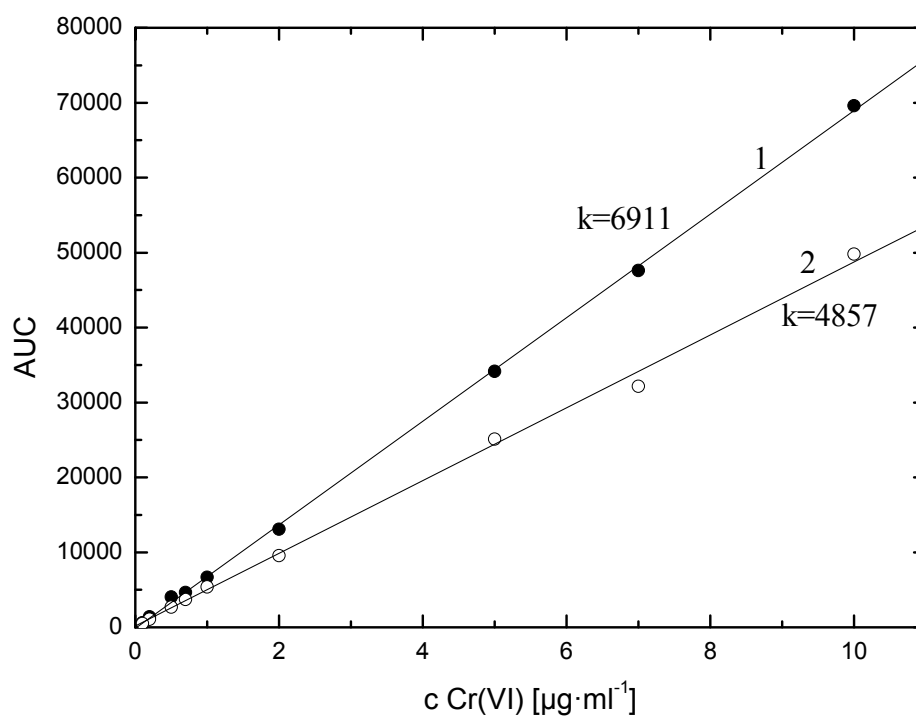
1 - H_2O , 2 - $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ CH}_3\text{COONH}_4$

Podmínky měření: $\text{MF} - 50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaClO}_4$, $\text{pH } 7$

$Q_{\text{MF}} = 1,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560\text{ nm}$, $200\text{ }\mu\text{l}$

Vzorky: $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{ Cr(III)} + 5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{ Cr(VI)} + 30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{ CDTA} + \text{H}_2\text{O}$ nebo $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ CH}_3\text{COONH}_4$

Po týdnu byla kalibrační řada vzorků s přidavkem octanu proměřena znovu. Zaznamenán byl určitý pokles citlivosti. Srovnání kalibrační závislosti týden starých a nově připravených roztoků ukazuje následující obrázek 6.16.



Obr. 6.16: Vliv $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$ na citlivost stanovení Cr(VI)

1 – nově připravené roztoky, 2 – týden staré roztoky

Podmínky měření: $\text{MF} - 50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

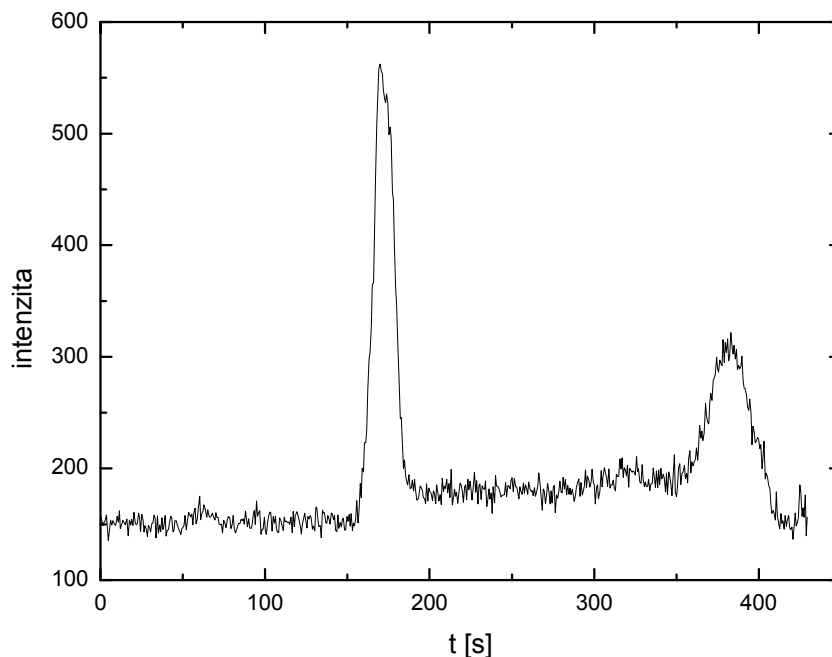
Vzorky: $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ Cr(III)} + 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ Cr(VI)} + 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ CDTA} + 1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$

6.3.2 Alkalická vyluhovací činidla

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům s použitím výše zmíněných kyselých činidel byla vyzkoušena činidla alkalická (Na_2CO_3 , NaOH), která by podle dostupných materiálů měla být k přípravě výluhů pro stanovení chromu také vhodná [27, 28].

6.3.2.1 Uhličitan sodný (Na_2CO_3)

Uhličitan sodný o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl použit k přípravě výluhů z rostlin pro stanovení Cr(VI) [27]. Proto jsme toto činidlo vyzkoušeli i pro potřeby našeho stanovení. Bylo provedeno měření závislosti signálu vzorku obsahujícího $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(III) nebo Cr(VI) s přidavkem $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ CDTA v prostředí uhličitanu sodného o koncentraci v rozmezí $0 - 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací činidla dochází u obou specií k postupnému vzniku dvou píků. Navíc docházelo také k podstatnému snížení citlivosti. I toto činidlo se tedy ukázalo pro chromatografické dělení specií chromu za daných podmínek jako nevhodné. Získané výsledky dokumentují obr. 6.17 a 6.18.

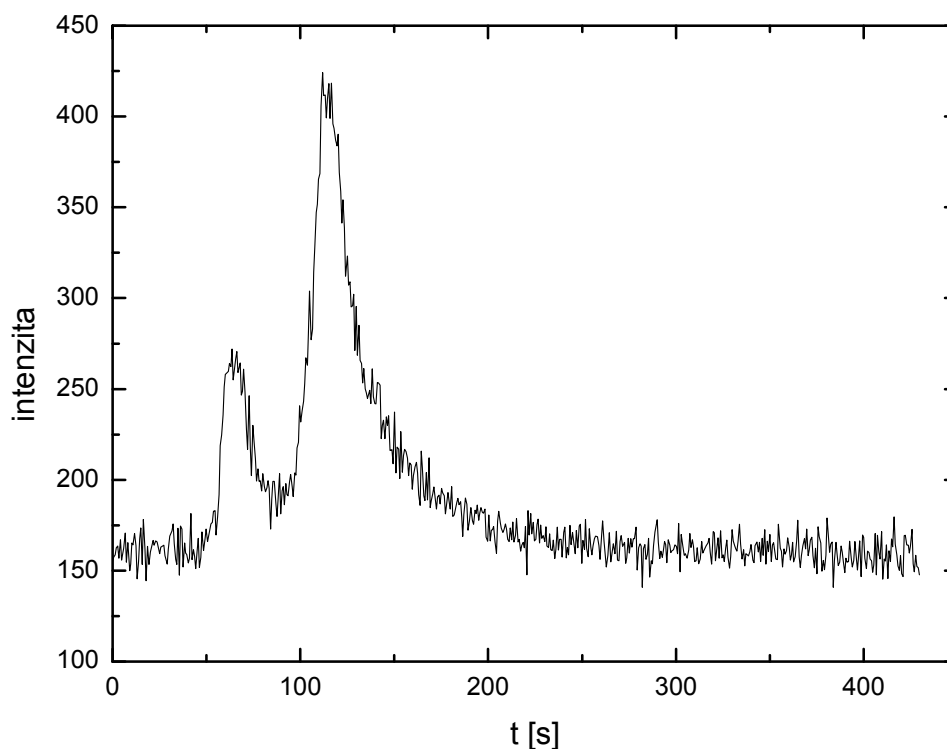


Obr. 6.17: Vliv $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ na stanovení Cr(VI)

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

Vzorek: $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ Cr(VI)}$ + $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ CDTA}$ + $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$



Obr. 6.18: Vliv $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ stanovení Cr(III)

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7

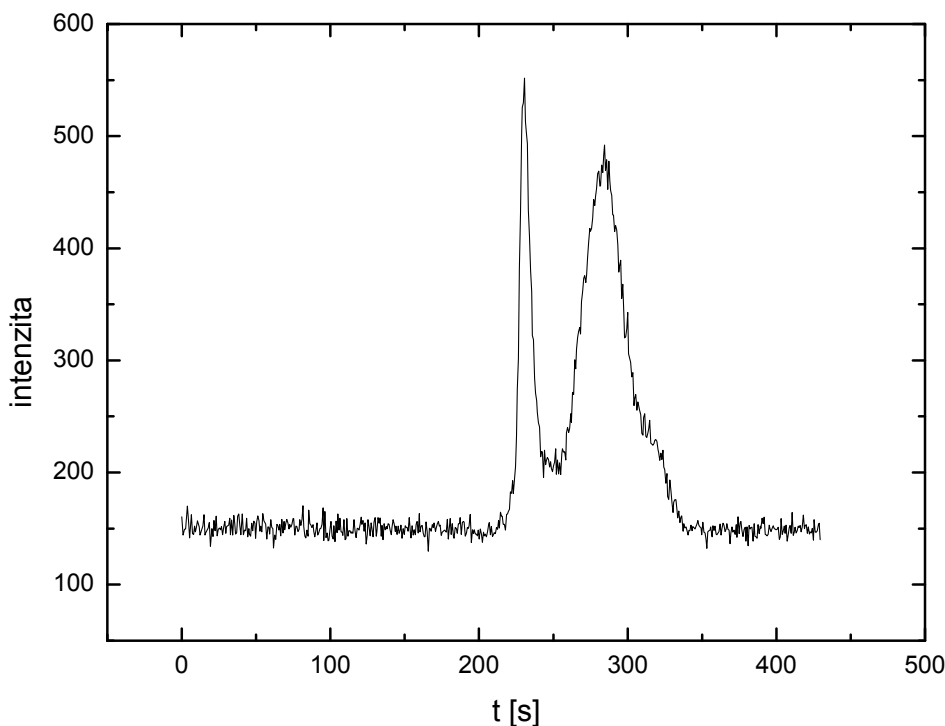
$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, $200 \mu\text{l}$

Vzorek: $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ Cr(III)}$ + $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ CDTA}$ + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$

6.3.2.2 Hydroxid sodný (NaOH)

Podle dalších dostupných zdrojů [28] je k přípravě výluhů pro stanovení Cr(VI) i k chromatografickému dělení vhodné použití NaOH o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejprve bylo provedeno, obdobně jako s předchozími činidly, měření závislosti intenzity odezvy

obou specií chromu na koncentraci NaOH. Sledován byl koncentrační rozsah 0 - 0,02 mol·l⁻¹. Vlivy byly následující. Pík odpovídající Cr(III) nebyl patrný už při koncentraci NaOH 0,002 mol·l⁻¹. Na místě Cr(VI) se s vzrůstající koncentrací činidla vytvářely dva píky. Toto uspořádání se tedy také neosvědčilo.



Obr. 6.19: Vliv 0,01 mol·l⁻¹ NaOH na stanovení Cr(VI)

Podmínky měření: MF – 50 mmol·l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol·l⁻¹ NaClO₄, pH 7

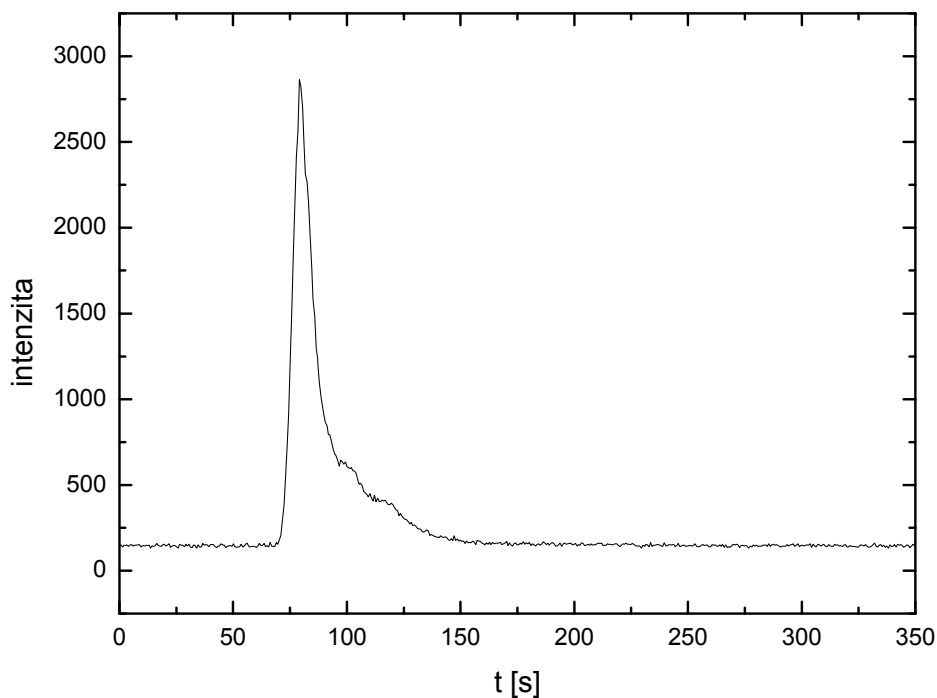
$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, 200 μl

Vzorek: 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + 30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ CDTA + 0,01 mol·l⁻¹ NaOH

Pro další měření byla zvolena nová mobilní fáze skládající se z HNO₃ o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹ a 0,5% metanolu, průtok mobilní fáze byl snížen na 1,2 ml·min⁻¹. Tyto podmínky odpovídaly dostupným literárním zdrojům [28].

S touto mobilní fází byly analyzovány směsné i jednoduché vzorky obsahující 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI) a Cr(III) připravené pouze ve vodě nebo v prostředí NaOH o koncentraci 0,01 mol·l⁻¹ s nebo bez přídavku 30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ CDTA. Celkem tedy bylo testováno 12 různých vzorků. Jako problém se při těchto experimentálních podmínkách ukázalo, že

eluční čas Cr(VI) se zkrátil na cca 100 s, Cr(III) eluoval v čase cca 80 s. Při analýze směsných vzorků tedy nebyly píky rozděleny.



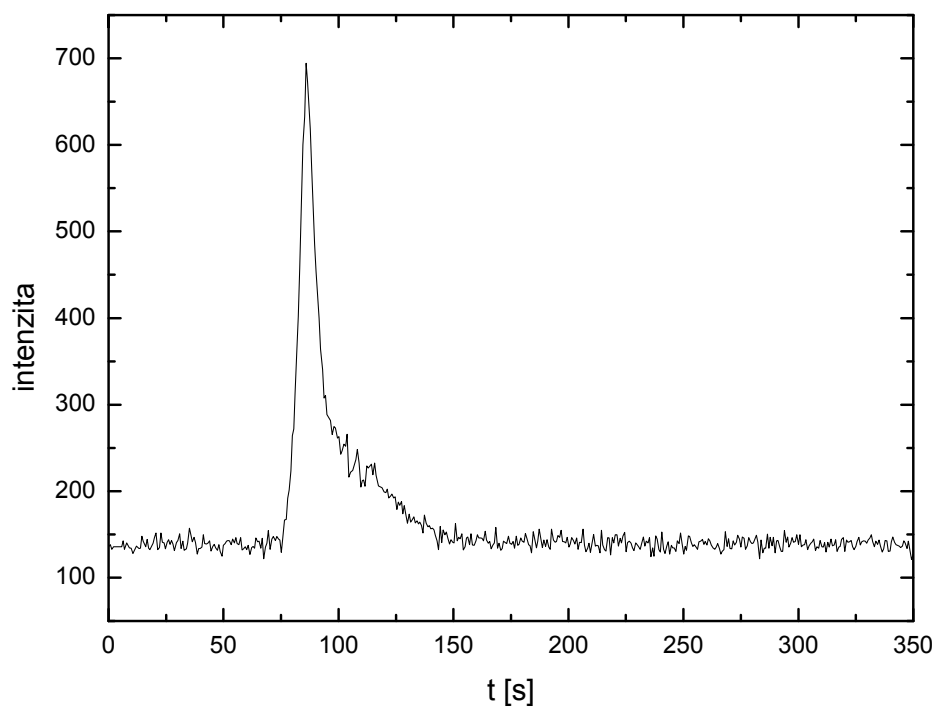
Obr. 6.20: signál směsného vzorku Cr(III) a Cr(VI)

Podmínky měření: MF – 0,1 mol·l⁻¹ HNO₃, 0,5% CH₃OH

Q_{MF} = 1,2 ml·min⁻¹, λ = 205,560 nm, 200 μl

Vzorek: 5 μg·ml⁻¹ Cr(III) + 5 μg·ml⁻¹ Cr(VI) + 30 μg·ml⁻¹ CDTA

K tomuto jevu docházelo bez ohledu na složení vzorku. Změna při analýze vzorků různého složení byla ve snížení citlivosti stanovení při použití vzorků s obsahem NaOH.



Obr. 6.21: signál směsného vzorku Cr(III) a Cr(VI) v prostředí NaOH

Podmínky měření: MF – 0,1 mol·l⁻¹ HNO₃, 0,5% CH₃OH

Q_{MF} = 1,2 ml·min⁻¹, λ = 205,560 nm, 200 μl

Vzorek: 5 μg·ml⁻¹ Cr(III) + 5 μg ml⁻¹ Cr(VI) + 30 μg·ml⁻¹ CDTA + 0,01 mol·l⁻¹ NaOH

7 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce byla zaměřená na vypracování speciálního stanovení anorganických forem Cr(III) a Cr(VI) kombinovanou technikou spojující HPLC s prvkově selektivním detektorem ve výluzech vzorků půd a poléťavého prachu.

V první části diplomové práce byly nejdříve optimalizovány experimentální podmínky pro speciální analýzu chromu touto kombinovanou technikou HPLC – IPC AES a určeny základní charakteristiky tohoto stanovení. Získané optimální separační podmínky jsou následující: mobilní fáze obsahující $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$ a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ o $\text{pH} = 7,0$; dávkovaný objem vzorku $200 \text{ } \mu\text{l}$ a přídavek komplexotvorného činidla CDTA ke vzorku o koncentraci $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Po zjištění pracovních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti a určeny základní charakteristiky tohoto kombinovaného stanovení. Získané meze detekce ($56 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ pro Cr(III) a $81 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ pro Cr(VI)) a meze stanovitelnosti odpovídají hodnotám uváděným v literatuře pro stanovení chromu metodu ICP – AES. Pokud by před spektrometr nebyla předražena chromatografická kolona, bylo by dosaženo ještě lepších detekčních limitů.

V další části práce pak byla sledována stabilita obou anorganických forem Cr v konkrétních vyluhovacích činidlech používaných pro frakcionaci. Bylo vyzkoušeno 5 vyluhovacích činidel, která jsou používána k přípravě výluhů v praxi. Bylo ale bohužel zjištěno, že buď nejsou specíe chromu stabilní v použitých extrakčních činidlech (Cr(VI)), nebo je daným činidlem ovlivněn separační proces (v případě NaOH) a nedojde k požadovanému dělení sledovaných specií chromu.

V daných možnostech se jako nejlepší jeví použití $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$, kdy sice dojde k výraznému snížení citlivosti stanovení Cr(VI), ale na rozdíl od jiných činidel nebyla pozorována vzájemná přeměna specií chromu. Snížení citlivosti stanovení by se dalo do jisté míry kompenzovat použitím nižší koncentrace kyseliny (tím by ale došlo ke snížení výtěžnosti při přípravě výluhů) nebo zvýšením dávkovaného objemu vzorku.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] J. Dědina: Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciální analýzu založenou na generování těkavých sloučenin. Seminář PACI (listopad 2007)
- [2] P. Rychlovský: Použití přístrojů pro atomovou spektrometrii jako prvkově selektivních detektorů při speciální analýze. Seminář PACI (duben 2008)
- [3] J. Száková: Chemická frakcionace prvků a její aplikace na půdy životního prostředí; Seminář PACI (listopad 2006)
- [4] W. Som-Aum; J. Threeprom; L. Haifang; L. Jin-Ming: Determination of chromium (III) and total chromium using dual channels on glass chip with chemiluminescence detection. *Talanta* **71**: 2062 – 2068 (2007)
- [5] V. Goméz; M.P. Callao: Chromium determination and speciation since 2000. *Trends in analytical chemistry*, **25**:10, 1006-1015 (2006)
- [6] M. Tichý: *Toxikologie pro chemiky*. Karolinum, Praha 2004
- [7] N. Kabay, M. Arda, B. Saha, M. Streat: Removal of Cr(VI) by solvent impregnated resins (SIR) containing aliquat 336; *React. Funct. Polym.* **54**: 103 – 115 (2003)
- [8] R. A. Gil; S. Cerutti; J. A. Gásques; R. A. Olsina; L. D. Martinez: Preconcentration and speciation of chromium in drinking water samples by coupling of on-line sorption on activated carbon to ETAAS determination. *Talanta* **68**: 1065 – 1070 (2006)
- [9] T. Sumida; T. Ikenoue; K. Hamada; A. Saharudin; M. Oshima; S. Motomizu: On-line preconcentration using dual mini-columns for the speciation of chromium(III) and chromium(VI) and its application to water samples as studied by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Talanta* **68**: 388 – 393 (2005)
- [10] K. Schwarz; W. Mertz: Chromium (III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem Biophys* **85**: 292 – 295 (1959)
- [11] S. J. Haylock; P. D. Buckley; L. F. Blackwell: The relationship of chromium to the glucose tolerance factor. II. I *Inorg Biochem* **19**: 105 – 117 (1983)
- [12] J. M. Ottaway; G.S. Fell: Determination of chromium in biological materials. *Pure Appl. Chem.* **58**: 1707 - 1720 (1986)

- [13] C. Barnowski; N. Jakubowski; D. Stuewer: Speciation of Chromium by Direct Coupling of Ion Exchange Chromatography With Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom* **12**: 1155 – 1161 (1997)
- [14] A. B. Gwizala III; S. K. Johnson; S. Mollah; R. S. Houk: Speciation of Chromium(VI) and Chromium(III) using Pneumatically Assisted Electrospray Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **12**: 503 – 506 (1997)
- [15] X. Zhu; B. Hu; Z. Jiang; Y. Wu; S. Xiong: Speciation of chromium(III) and chromium(VI) by in situ separation and sequential determination with electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **471**: 121 – 126 (2002)
- [16] L. V. Malaudzi; J. F. Staden; R. I. Stefan: Determination of chromium(III) and chromium(VI) by use of a spectrophotometric sequential injection system; *Anal. Chim. Acta* **467**: 51 – 60 (2002)
- [17] T. W. Lin; S. D. Huang: Direct and Simultaneous Determination of Copper, Chromium, Aluminum, and Manganese in Urine with a Multielement Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer. *Anal. Chem.* **73**: 4319 – 4325 (2001)
- [18] R. A. Anderson: Nutritional role of chromium. *Sci. Total environ.* **17**: 13 – 29 (1981)
- [19] H. Kim; S. Lee; B. Jang: Subchronic inhalation toxicity of soluble hexavalent chromium trioxide in rats. *Arch. Toxicol* **78**: 363-368 (2004)
- [20] Health Effects Assessment for Hexavalent Chromium. EPA 540/1-86-019; U.S. Environmental Protection Agency (EPA): Washington DC, 1984
- [21] I. Němcová; L. Čermáková; P. Rychlovský: *Spektrometrické analytické metody I*, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 1997
- [22] K. Štulík a kol.: *Analytické separační metody*. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 2004
- [23] E. Peroutková: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2008
- [24] K. Eckschlager: *Chemometrie I. a II.* Univerzita Karlova, Praha 1994
- [25] J. G. K. Ševčík: *Metodologie měření v analytické chemii*, Karolinum, Praha 1999

- [26] ZuLiang Chen; M. Megharaj; R. Naidu: Speciation of chromium in waste water using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **72**: 394–400 (2007)
- [27] N. Panichev; K. Mandiwana; M. Kataeva; S. Siebert: Determination of Cr(VI) in plants by electrothermal atomic absorption spectrometry after leaching with sodium carbonate. *Spectrochimica Acta B* **60**: 699-703 (699-703)
- [28] T. Narukawa; K. W. Riley; D.H. French; K. Chiba: Speciation of chromium in Australian fly ash. *Talanta* **73**: 178-184 (2007)